

00551 13

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE QUIMICA

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUIMICAS

299116

BASE MOLECULAR DE LA MODULACION NEGATIVA
"DOWN-REGULATION" QUE PRESENTA LA
PROTEINA CINASA C COMO RESULTADO DE SU
ACTIVACION EN HEPATOCITOS DE RATA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)

P R E S E N T A :

BIOL. HECTOR GONZALEZ AGUILAR

ASESOR: DRA. MARTHA ROBLES FLORES

MEXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el
Departamento de Bioquímica
de la Facultad de Medicina,
UNAM, bajo la dirección de
la Dra. Martha Robles.

Agradezco a los miembros del Jurado:

Dr. Ignacio Camacho Arroyo,
Dr. Rolando Hernández Muñoz,
Dr. Armando Tovar Palacio,
Dr. Jorge Vázquez Ramos y
Dr. Alejandro Zentella Dehesa
por sus comentarios y sugerencias en
la revisión de la presente Tesis.

INDICE

Resumen	
Introducción	1
Componentes de la vía de transducción de señales	3
La proteína cinasa C en la transducción de señales	6
Descripción estructural de la proteína cinasa C	8
Activadores y cofactores de la PKC	12
Distribución tisular y funciones biológicas de la PKC	12
Regulación de la proteína cinasa C	15
Justificación	22
Hipótesis	22
Objetivos	22
Procedimientos experimentales	24
Resultados	30
Discusión	48
Conclusiones	59
Referencias	60

RESUMEN

La transducción de señales es el proceso por el cual una señal extracelular produce mensajes intracelulares que inducen respuestas fisiológicas. La proteína cinasa C (PKC) es parte integral del sistema de transducción de señales hormonales acoplado a receptores que inician la degradación de componentes lipídicos de las membranas. La PKC es una familia de 12 isoenzimas de cinasas de residuos de serina-treonina: alfa, beta I, beta II, gamma, delta, épsilon, eta, theta, mu, nu, zeta y lambda/iota.

Esta familia de enzimas son activadas en la vía de transducción por fosfolípidos ácidos, particularmente la fosfatidilserina, pero que tienen diferentes requerimientos por calcio, dialciglicerol y derivados de fosfolípidos. Su activación también se puede efectuar con fármacos, como los ésteres de forbol, especialmente el TPA (tetradecanoil-forbolacetato). Como resultado de la activación de las PKCs, estas enzimas presentan el fenómeno de translocación a diversos sitios subcelulares (membrana plasmática, elementos del citoesqueleto y núcleo). La regulación de la PKC comprende a dos mecanismos: la activación y la modulación negativa o "down-regulation", implicados en la acción catalítica y en el recambio celular de la enzima respectivamente. La modulación negativa se define como la inactivación catalítica y la posterior degradación proteolítica de la enzima. La inducción de este fenómeno parece ser consecuencia de su activación. Recientemente se ha encontrado que la desfosforilación parcial de la PKC induce una pérdida en la estabilidad molecular de la enzima que la vuelve inactiva y la sensibiliza a la acción de fosfatasa y agentes oxidantes, predisponiéndola a su modulación negativa.

En la actualidad, los aspectos moleculares de la modulación negativa de la PKC, después de ser activada, no han sido dilucidados. La presente tesis se enfocó a investigar, en hepatocitos de rata Wistar, algunos fenómenos bioquímicos relacionados a la modulación negativa de varias isoformas de la PKC como consecuencia de su activación con TPA o epinefrina durante breves periodos de tiempo.

Para este fin, se evaluó la modulación negativa bajo los siguientes parámetros experimentales: a) detección por ensayos de inmunotransferencia de la expresión de las isoenzimas de PKC en hepatocitos de rata, b) ensayos de redistribución de las isoenzimas de PKC después de ser activadas vía hormonal o farmacológica y c) análisis *in vitro* de la actividad enzimática de las PKCs, después de ser activadas con TPA y epinefrina, cambiando las condiciones de su estado de fosforilación, en presencia y en ausencia de inhibidores de fosfatasa.

INTRODUCCION

Las células de todos los organismos son capaces de reaccionar a los estímulos del exterior. La respuesta celular produce cambios en el metabolismo, y en consecuencia, en la regulación de fenómenos tales como la secreción, la diferenciación, el crecimiento y la división celular.

La comunicación que la célula viva mantiene con su medio ambiente se presenta en dos formas diferentes, el sistema hormonal o endócrino y el sistema nervioso. En ambos sistemas la comunicación intercelular es por medio de mensajeros químicos. Estos mensajeros pueden ser de naturaleza hidrofóbica o de tipo hidrofílico. La diferencia entre ellos se basa en la forma en cómo se procesa y se envía la señal al interior celular. Por una parte, los mensajeros hidrofóbicos, tipo hormonas esteroides, son capaces de traspasar la bicapa lipídica e interactuar con receptores intracelulares específicos, formando un complejo esteroide-receptor que se une a la cromatina nuclear, lo que provoca cambios a nivel transcripcional y de síntesis de proteínas que resultan finalmente en la expresión del efecto de la hormona esteroide (1). Los mensajeros de tipo hidrofílico no pueden atravesar la membrana plasmática, y por este motivo la célula presenta un sistema de comunicación denominado transducción de señales, en donde es necesaria la interacción de los ligandos con receptores de superficie celular para poder transmitir el mensaje dentro de la célula. En general, un sistema de transducción de señales consta de cuatro elementos: receptores, transductores, efectores y amplificadores, todos ellos coordinados para captar, transmitir, interpretar y propagar la señal generada por el primer mensajero (fig 1). En consecuencia, el primer mensajero de tipo hidrofílico se une específicamente a un receptor de superficie celular compuesto de siete dominios transmembranales, el cual se encuentra acoplado a una proteína transdutora, llamada proteína G, para transmitir la señal; el papel de dicha proteína G es modular la afinidad del agonista con su receptor y ensamblar esta interacción con ciertos sistemas efectores (tipo fosfolipasa y adenilato ciclasa) quienes al activarse generan segundos mensajeros en forma de cationes y otro tipo de moléculas. El segundo mensajero es reconocido con gran afinidad por la proteína amplificadora (Proteína Cinasa C por ejemplo) que propagará la señal en el interior de la célula.

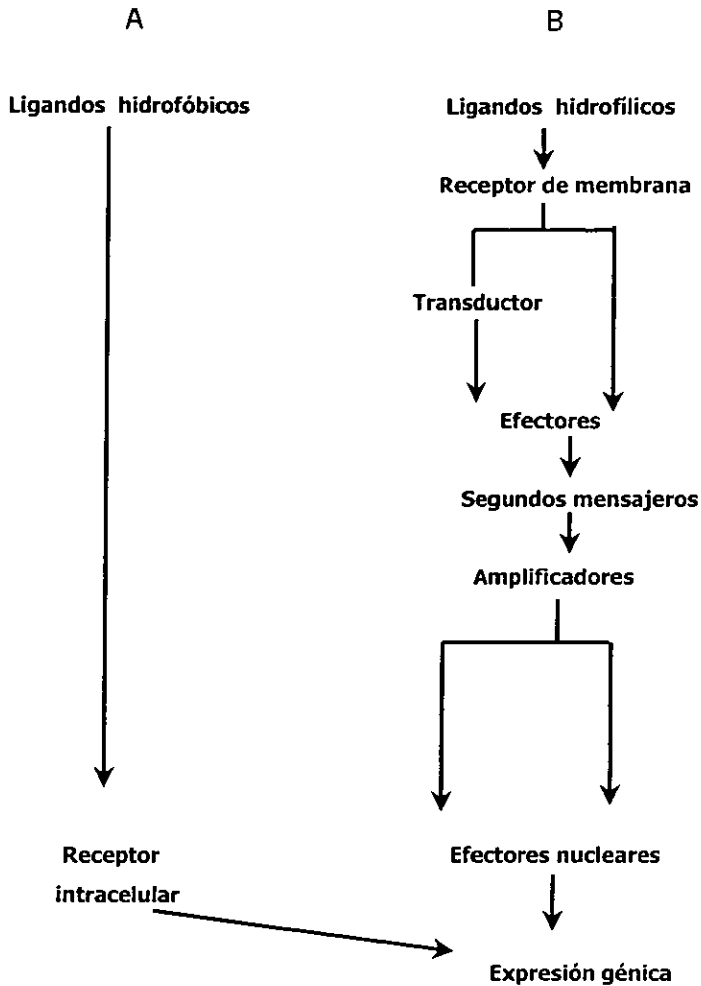


Figura 1.- Descripción esquemática de la transducción de señales. En **A** los ligandos hidrofóbicos difunden a través de la membrana plasmática, se unen a sus receptores nucleares y este complejo modula directamente la transcripción. En **B** los ligandos hidrofílicos deben unirse a receptores de membrana y desencadenar una serie de reacciones bioquímicas en cascada para poder transducir la señal al interior de la célula.

Componentes de la vía de transducción de señales

Receptores

Existen tres tipos de receptores de superficie implicados en la transducción de señales, clasificados de acuerdo a su topología membranar y a los mecanismos moleculares que utilizan para transducir la señal:

A) Receptores que operan canales membranales en donde la unión del primer mensajero con la cara extracelular del receptor causa la apertura o cierre de un canal iónico, el cual forma parte de la estructura del receptor. Estos receptores pueden estar acoplados a proteínas G; ejemplos de ellos son los receptores de glicina, de GABA (ácido γ -aminobutírico) y los receptores muscarínicos. La topología para los muscarínicos consiste de cuatro subunidades polipeptídicas, mientras que para los receptores de GABA y glicina tienen dos subunidades, combinadas de tal manera que forman una estructura tipo barril con una región central hidrofílica en donde pasan los cationes; todas las subunidades de estos receptores están conformadas por cuatro regiones transmembranales, los extremos amino y carboxilo terminales se localizan en la cara extracelular. Generalmente el amino terminal se encuentra glucosilado (2).

B) Receptores compuestos por un solo segmento transmembranar, con funciones catalíticas intrínsecas en su región citosólica, el cual se activa al unirse el primer mensajero a la parte extracelular del receptor. La actividad catalítica puede ser de cinasa de residuos de tirosina (receptores de insulina, del factor de crecimiento epidérmico -EGF- y del factor de crecimiento derivado de plaquetas -PDGF-) y de serina/treonina cinasa (factor β de crecimiento transformante -TGF β -, activinas y proteínas morfogenéticas óseas); también se han hallado receptores con actividad de tirosina fosfatasa muy ligados a los fenómenos de adhesión célula-célula y los receptores de guanilato ciclasa que responden a factores natriuréticos (3).

C) Receptores carentes de actividad enzimática clasificados en dos tipos de acuerdo a su topología: uno conformado con un dominio transmembranar y el otro con siete dominios transmembranales. Los primeros, no dependientes de proteínas G, corresponden a receptores de citocinas y a las integrinas quienes al unírseles el ligando, reclutan a tirosina cinasas citosólicas como JAK, FAK y Scr (3). Los segundos son receptores que necesitan la asociación con proteínas G transductoras para promover la señal. Sus ligandos son hormonas o neurotransmisores como la epinefrina, dopamina, adenosina, trombina, angiotensina II y otras (4).

Transductores

Los elementos transductores son las llamadas proteínas G, acopladas a receptores de siete dominios transmembranales. Son moléculas heterotriméricas compuestas por las subunidades α , β y γ . La subunidad α une a una molécula de GDP y además posee una capacidad de GTPasa intrínseca. Se han descrito varias clases de proteínas G: las que incluyen a G_s y G_i , estimuladoras e inhibidoras de la enzima adenilato ciclasa y reguladoras de canales membranales de Ca^{2+} y K^+ ; a G_q que activa a la enzima fosfolipasa C y G_{12} que está involucrada en los canales de Na^+/H^+ y de Ca^{2+} (5). La función de las proteínas G es modular la afinidad del agonista por su receptor, y al mismo tiempo, acoplar esta interacción con los sistemas efectores encargados de producir los segundos mensajeros. Al activarse la proteína G experimenta un ciclo de rearrreglos moleculares necesario para cumplir su función: la unión receptor-agonista cataliza el intercambio del GDP, unido a la subunidad α , por GTP, lo que provoca la disociación del complejo GTP- α de las subunidades $\beta\gamma$. Dependiendo del sistema, los complejos GTP- α o $\beta\gamma$ intervienen por separado en la activación de la proteína efectora correspondiente. Debido a que la subunidad α posee actividad de GTPasa, es capaz de hidrolizar GTP y formar nuevamente el complejo GDP- α que de nuevo se reasocia al heterodímero $\beta\gamma$ y regenera a la proteína G trimérica inactiva la cual está lista para repetir el ciclo (5) [figura 2].

Efectores

Las moléculas efectoras son enzimas unidas a membrana, activadas en varios sistemas celulares por las proteínas G, capaces de generar segundos mensajeros en el proceso de señalización. Estas moléculas comprenden a varios tipos de fosfolipasas y a la adenilato ciclasa. Las fosfolipasas están agrupadas en cuatro tipos: fosfolipasa A1 (PLA1), fosfolipasa A2 (PLA2), fosfolipasa C (PLC) y fosfolipasa D (PLD). Dicha clasificación está basada en el sitio que hidroliza la enzima en el esqueleto fosfolipídico, con la subsecuente producción de diversos tipos de lípidos y ácidos grasos (6). Cada tipo de fosfolipasa se compone de varias isoformas. Las fosfolipasas que intervienen en la transducción de señales son PLA2, PLC y PLD. Estas enzimas generan sus productos a partir de diferentes sustratos fosfolipídicos. Así entonces, para PLA2 los productos de su acción enzimática son ácidos grasos libres (como el araquidonato) y la lisofosfatidilcolina, a partir de fosfatidilcolina; estos productos, además de actuar en la señalización como potenciadores de la actividad de la proteína amplificadora (PKC), también son precursores de lípidos de importancia metabólica tales como prostaglandinas, leucotrienos y el factor activador de plaquetas. Por su parte la PLD, a partir de la fosfatidilcolina, produce ácido fosfatídico que puede ser metabolizado para formar diacilglicerol (DAG). La PLD se ha implicado en el tráfico membranar y en el transporte vesicular. La PLC está compuesta por tres isoformas: β , γ y δ . Para activar a la PLC se han descrito mecanismos diferentes según la isoforma afectada; así mientras que la activación de PLC β_1 es mediada por la subunidad α de la proteína G tipo q, la PLC β_2 es estimulada por el complejo $\beta\gamma$ de

proteínas G tipo i. Ambas isoformas de PLC catalizan la producción de los segundos mensajeros DAG e inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) a partir del fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato [PIP₂] (6). La PLC γ se asocia con receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina o con cinasas de residuos de tirosina citosólicas y es activada por la fosforilación en residuos de tirosina. La PLC δ se ha propuesto que interactúa con una proteína G tipo h asociada con receptores α -1 adrenérgicos (7).

La adenilato ciclasa es una proteína integral de membrana con doce segmentos transmembranales que cataliza la conversión de ATP a AMP cíclico, otro segundo mensajero. Se conocen hasta el momento nueve tipos de adenilato ciclasas en células de mamífero, todas ellas susceptibles de activarse mediante la subunidad α de la proteína G (G α s) y también moduladas por G α i y por las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G (4).

Segundos mensajeros

Los segundos mensajeros son moléculas que difunden la señal proveniente de la enzima efectora y algunos de ellos pueden también formar parte de vías metabólicas intermediarias. Entre los más conocidos están: el AMP cíclico, el GMP cíclico, el IP₃, el DAG y el Ca²⁺ que promueven la actividad de las proteínas amplificadoras e intervienen en múltiples respuestas celulares (4). Existen otros segundos mensajeros de tipo lipídico como el ácido fosfatídico, el ácido lisofosfatídico y la ceramida provenientes del metabolismo de glicerofosfolípidos y de esfingolípidos. Para los dos primeros se ha propuesto que intervienen en la regulación del crecimiento celular, agregación plaquetaria, en respuestas inflamatorias y proliferativas inducidas por daño mecánico. Respecto a la ceramida parece ser que es un mediador de las respuestas apoptóticas e inflamatorias reguladas por el factor de necrosis tumoral [TNF- α] que se genera por activación de una esfingomielinasa que hidroliza los esfingolípidos(6). Otros segundos mensajeros son los ácidos grasos libres como el ácido oleico y el ácido araquidónico, quienes en condiciones *in vitro* son capaces de actuar como activadores de la proteína cinasa C (7).

Amplificadores

Los elementos amplificadores reconocen con gran afinidad y especificidad a los segundos mensajeros y se encargan de propagar la señal a través de la modificación covalente de una gran variedad de proteínas citosólicas efectoras. Dentro de estos amplificadores se encuentran las proteínas cinasas de residuos de serina/treonina, quienes incorporan el grupo fosfato posición γ , proveniente del ATP, a residuos de serina o treonina de las moléculas blanco. Este grupo incluye a las cinasas asociadas a nucleótidos cíclicos como las proteínas cinasas A y G (PKA, PKG), a la familia de la proteína cinasa C (PKC), dependiente de Ca²⁺ y diacilglicerol, y las cinasas dependientes de Ca²⁺/calmodulina (CaMK) (3). Existen también proteínas cinasas efectoras no reguladas directamente por segundos mensajeros, sino a través de las proteínas amplificadoras sensibles a éstos. Ejemplo de ellas son las cinasas dependientes de

ciclinas (CDKs), algunas cinasas de la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas), la caseína cinasa II y Raf-1 (3). Además se encuentran las cinasas citoplásmicas de residuos de tirosina, que transfieren el grupo fosfato y del ATP al residuo tirosina de las proteínas blancas. Ejemplos de estas enzimas son Src, Csk, JAK, FAK entre varias más. Estas cinasas participan preferentemente en el control del crecimiento y la diferenciación celular(3).

Otro tipo de enzimas amplificadoras de señal son las fosfatasa de residuos de tirosina y las fosfatasa de residuos de serina/treonina quienes son capaces de activar o inhibir a sus blancos mediante la remoción de un grupo fosfato del residuo afectado. Hasta el momento se conocen cuatro tipos de fosfatasa de residuos de serina/treonina en mamíferos: (PP1, PP2A, PP2B, conocida como calcineurina, y PP2C). Están clasificadas de acuerdo a su sensibilidad a inhibidores de fosfatasa (ácido okadaico e inhibidores 1 y 2) y a su regulación por cationes divalentes (4, 6).

La intervención de los elementos amplificadores proporciona al proceso de transducción una gran capacidad de sensibilidad al estímulo debido a que una pequeña concentración de la señal produce el efecto celular específico, lo que está directamente relacionado al poder amplificador de las enzimas cuya capacidad de cinasa o fosfatasa inducen en sus sustratos cambios conformacionales que regulan su acción fisiológica. Los amplificadores tienen la capacidad de interactuar con una amplia variedad de proteínas, sugiriendo una gran flexibilidad, lo que hace posible la existencia de una interconexión versátil con los elementos de la vía de señalización, es decir, que los amplificadores actúan de manera multidireccional en vez de que su acción se limite a ser simplemente unidireccional (4).

La proteína cinasa C en la transducción de señales

Dentro del amplio panorama existente en la transducción de señales, a continuación se profundizará en la vía de los receptores acoplados a proteínas G sin actividad catalítica intrínseca. Estos receptores se pueden dividir en dos tipos, dependiendo del efector implicado: uno de ellos relacionado directamente con la enzima adenilato ciclasa y el otro que involucra el recambio de fosfoinosítidos en donde se ubica a la proteína cinasa C (PKC).

En 1975, Robert Michel propuso que el mecanismo de transducción para un gran número de señales, mediada por receptores con siete dominios transmembranales, tiene como paso inicial el aumento en el recambio de fosfoinosítidos asociado a cambios en la concentración intracelular de calcio (8). El esquema actual de este sistema de transducción involucra una serie de acontecimientos bioquímicos esbozados en la figura 2:

Como se puede ver en dicha figura, H es la hormona o primer mensajero. R es un receptor (glucoproteína) con siete dominios transmembranales, unidos entre sí por asas intra y extracelulares, carente de actividad enzimática, acoplado a proteínas G (transductor). El receptor activado por H, cambia de conformación debido al contacto de la región activa del agonista con las regiones transmembranales del receptor, y de este modo es capaz de estimular a una proteína Gq o Gi provocando el recambio de GDP por GTP y la disociación de Gq o de Gi en sus componentes α y $\beta\gamma$. La subunidad α -GTP activa a la fosfolipasa C $\beta 1$ (PLC- $\beta 1$), mientras que el complejo $\beta\gamma$ activa a la PLC $\beta 2$. (9, 10, 11).

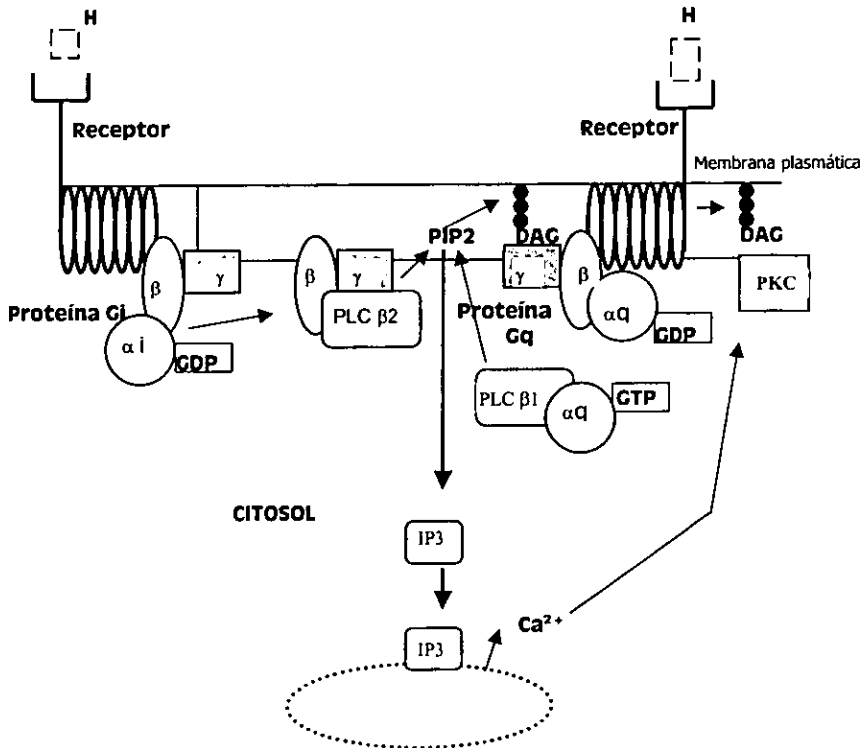


Figura 2.- Componentes de la vía de transducción de señales en receptores sin actividad enzimática acoplados al sistema de recambio de fosfoinosítidos. H, hormona o agonista, cuadro blanco; el receptor consta de siete dominios transmembranales acoplado al transductor (proteína G) integrado por tres subunidades α , β y γ ; el efector, fosfolipasa C β (PLC β) quien actúa sobre el fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP₂) produciendo dos segundos mensajeros: inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG); retículo endoplásmico liso, óvalo discontinuo; amplificador: PKC que propaga la señal hasta producir la respuesta celular.

Las fosfolipasas A2, PLC y PLD son las moléculas efectoras de este sistema de transducción. En el esquema, se describe el sistema clásico mejor estudiado en el que la PLC es el efector. Como puede apreciarse en la figura 2, PLC- β 1 ó PLC- β 2 hidrolizan al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂), localizado en la lámina interna de la membrana plasmática, y produce dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃); el primero activa directamente a la proteína cinasa C (PKC), mientras que el IP₃ se une a un receptor del retículo endoplásmico liso y promueve la salida del ión Ca²⁺ hacia el citosol, incrementando su concentración; dicho aumento influye en la activación de múltiples enzimas, entre ellas algunas isoformas de PKC (4).

La proteína cinasa C (PKC) como parte amplificadora de la señal, se encarga de fosforilar a una variedad de péptidos y proteínas intracelulares que a su vez activan o inhiben a otras proteínas cinasas y/o fosfatasas. El resultado es la formación de una "cascada" de cambios bioquímicos que desembocarán en una respuesta celular específica.

Descripción estructural de la Proteína cinasa C

La PKC comprende una familia de 12 isoenzimas de cinasas de residuos de serina/treonina en mamíferos para las que se han identificado enzimas homólogas en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), nemátodos (*Caenorhabditis elegans*) y en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). La PKC fue descubierta en 1977 por el grupo de Yasutomi Nishizuka e inicialmente se le consideró como una enzima activada por Ca²⁺. Posteriormente, se descubrió que la PKC interactúa con el diacilglicerol y al encontrarse que es el principal blanco de los ésteres de forbol (sustancias promotoras de tumores), se despertó un gran interés por conocer su mecanismo de acción (12, 13).

Las doce isoformas de la familia PKC son: α (alfa), β I y β II (beta I y II), γ (gamma), δ (delta), ϵ (epsilon), η (eta), θ (theta), μ (mu), ν (nu), ζ (zeta) y λ /i (lambda o iota). Cada miembro de la familia difiere en su modo de activación pero todas tienen en común el requerir de fosfatidilserina para activarse. De acuerdo al modo de activación y a su estructura, las isoformas se clasifican en tres subfamilias: **I**) las PKC convencionales (α , β I, β II, γ) que se distinguen porque su activación depende de la presencia de Ca²⁺, diacilglicerol, o su análogo farmacológico los ésteres de forbol, en particular el TPA (tetradecanoilforbol-acetato); las isoformas β I y β II derivan de un solo gen, a partir de procesamiento alternativo del RNAm. **II**) las PKC nuevas (δ , ϵ , η , θ , μ , ν) que se activan con diacilglicerol o TPA aunque no dependen de Ca²⁺; **III**) las PKC atípicas (ζ , λ /i) cuya activación no requiere de la presencia de TPA o diacilglicerol ni calcio, en su lugar se ha visto que se activan por el fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato, producto de la cinasa que fosforila en posición inositol-3 (PI-3 cinasa) y por ácidos grasos libres (14). Otro tipo de proteínas emparentadas a la PKC son las PRKs (cinasas relacionadas a las PKC) cuya activación no es dependiente de Ca²⁺, DAG o TPA. La PRKs comparten una gran similitud en su dominio catalítico y con partes del dominio regulador con los dominios equivalentes de las PKCs (15) (figura 3).

La estructura básica de las PKCs consiste en un polipéptido cuyo tamaño abarca de los 70 a 90 kilodaltones (kDa). Comprende cuatro regiones constantes y cinco regiones variables distribuidas en un dominio regulador amino terminal de 40 KDa, cuyas regiones constantes son afines a fosfolípidos de membrana, y en un dominio catalítico carboxilo terminal de 45 KDa, con regiones constantes muy conservadas entre los miembros de la familia y con una homología cercana a cinasas como la PKA. Ambos dominios están conectados por una región bisagra variable V3. Las isoformas μ y ν tienen una estructura especial propia, que las distingue de las restantes isoformas aunque funcionalmente se ubican en el grupo de las PKCs nuevas (14, 16) (figura 3).

De acuerdo a la figura 3 todas las PKC contienen una o dos regiones constantes C1 (C1A y C1B) con dos secuencias importantes para la regulación de la enzima:

A) El fragmento pseudosustrato, cercano al extremo amino terminal de C1, que contiene una pequeña secuencia de aminoácidos similar al sitio de fosforilación de los sustratos de la enzima, en donde la presencia de alanina en vez de serina o treonina le confiere propiedades inhibitorias para el dominio catalítico. Este fragmento no está presente en las PKCs μ y ν . Normalmente la región catalítica se mantiene bloqueada debido a la interacción con el segmento pseudosustrato y la enzima permanece inactiva en ausencia de activadores (14).

B) La secuencia rica en cisteínas llamada "dedos de zinc", debido a que está coordinada con dos átomos de zinc, la cual es indispensable para la unión del DAG o TPA a través de la formación de puentes de hidrógeno entre estos compuestos y los grupos sulfhidrilos de las cisteínas (17). Se ha propuesto que la enzima se coordina con los átomos de zinc para acercar residuos que se encuentran relativamente distantes en la secuencia primaria, de manera que estos enlaces serían indispensables para mantener el plegamiento adecuado de la proteína (18). Esta secuencia está repetida dos veces en las PKCs convencionales y nuevas (C1A y C1B), mientras que en las PKC atípicas solamente se localiza un solo "dedo de zinc" (C1).

Estudios estructurales de las PKC convencionales con rayos X y resonancia magnética nuclear, han establecido que la región C1 se pliega en una estructura globular rica en hojas beta plegadas, de tal suerte que se provee un sitio de unión a los ligandos DAG y TPA (18). Se ha postulado que la falta de activación de las PKC atípicas por ésteres de forbol, se debe a que su región C1 carece de secuencias consenso presentes en las regiones C1 y C2 de las PKC convencionales lo cual no permite su enlace con el DAG ni con el TPA (19). No se conoce la función que desempeña este único "dedo de zinc" en las PKC atípicas. Se han encontrado estructuras homólogas a estos "dedos de zinc" en proteínas que interactúan con ADN y en otro tipo de cinasas como la Raf-1, la DAG cinasa, la n-quimerina, Vav y Unc-13 (15).

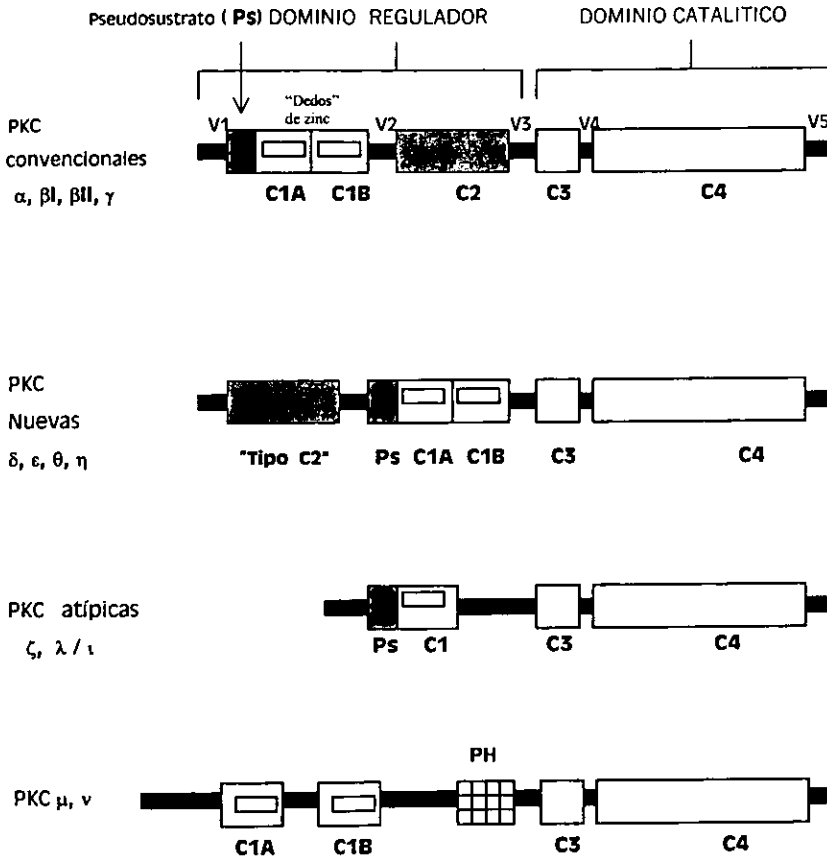


Figura 3.- Representación esquemática de la estructura de los subtipos de la PKC: convencionales, nuevas y atípicas: Las PKC μ y ν son las más grandes de la familia con 115 KDa, están ubicadas funcionalmente en las PKC nuevas y poseen rasgos únicos: en C1 los motivos "dedos de zinc" están separados por 74 residuos, carecen de segmento pseudosustrato y en cambio se encuentran una secuencia transmembranal y una región PH (homóloga a pleckstrina). En las PKC nuevas la región tipo C2 es incapaz de unir iones Ca^{2+} . Ps: segmento pseudosustrato. C1: sitio de unión de TPA/DAG "dedos de zinc". C2: sitio de unión a Ca^{2+} . C3: sitio de unión de ATP. C4: sitio del asa de activación. V3: región bisagra. V5: extremo carboxilo terminal.

La región constante C2, hallada en las PKC convencionales, contiene el sitio de unión para el Ca^{2+} , aunque no es la estructura típica de "brazo EF" encontrada en otras proteínas que unen Ca^{2+} . La estructura de la región C2, revelada por rayos X y resonancia magnética nuclear indica un arreglo de ocho hojas beta antiparalelas apiladas con asas agrupadas de manera que forman una cavidad flanqueada por cinco residuos de aspartato los cuales coordinan la interacción con al menos 2 iones Ca^{2+} . Por el contrario, el "brazo EF" une solamente un calcio dentro de una estructura hélice-asa-hélice (20). Las PKC nuevas poseen estructuras parecidas a C2, en donde existen secuencias consenso que se pliegan de forma similar a esta estructura, aunque no unen iones calcio debido a la carencia de residuos de aspartato en esta región (21).

Hasta el momento no se conoce con precisión la zona de C2 que contacta con la membrana. Se ha descartado que el Ca^{2+} funcione como un puente electrostático entre C2 y la membrana. Diversos estudios sugieren que las asas formadoras del sitio de unión al calcio sean las que contacten con la membrana, sin conocerse aún con precisión el papel del Ca^{2+} en la interacción con los fosfolípidos. Posiblemente el Ca^{2+} sea responsable de un cambio conformacional que permita la apertura de un hueco en donde se inserten regiones fosfolipídicas, como se ha sugerido por la estructura cristalina de la C2 en la PLC- δ 1 (22). C2 también se ha encontrado en proteínas como PLA₂, PLC- γ , PLC- δ , sinaptotagmina y rabfilina las cuales participan en fenómenos de transducción de señales o en tráfico membranar. Al igual que en PKC la presencia de este módulo les da la propiedad de unirse a la membrana en presencia de Ca^{2+} (15).

Intermedio entre el dominio regulador y el dominio catalítico se localiza una secuencia "bisagra" V3 que se vuelve sensible a proteólisis cuando la PKC se une a membrana. La proteólisis de V3 genera la liberación del dominio catalítico conocido como proteína cinasa M (PKM), el cual al no estar en contacto con el sitio pseudosustrato, se vuelve constitutivamente activo (13).

Por otra parte, están las regiones constantes C3 y C4, localizadas en el dominio catalítico, en donde C3 es una secuencia típica de unión para el ATP, común para todas las cinasas, y C4 que contiene a un segmento llamado asa de activación necesario para volver catalíticamente competente a la enzima mediante fosforilación en un residuo de treonina o de serina. Este residuo de treonina y los residuos que lo flanquean igualmente se han encontrado en otras cinasas, lo que indica que esta asa de activación es común para la actividad de las proteínas cinasas. También se encuentran una serie de secuencias consenso que reconocen al sustrato quienes intervienen también en la transferencia del grupo fosfato y del ATP (23, 24).

La región llamada V5 ubicada en la parte terminal del extremo carboxilo al parecer tiene funciones importantes para la enzima. Una de ellas se refiere a su localización celular. Se ha encontrado

que PKC β I y β II difieren precisamente en la región V5; en células monocíticas U937 se descubrió que PKC β I se localiza en los microtúbulos mientras que PKC β II se ubica en gránulos de secreción (25). El otro papel radica en la regulación de la enzima, pues en V5 se localizan dos sitios de fosforilación importantes para la estabilidad estructural y catalítica de las PKCs.

Activadores y cofactores de la PKC

El Ca^{2+} fue el primer cofactor reportado originalmente por el grupo de Nishizuka en 1977. Su papel se ha establecido concretamente para las PKC convencionales, en donde es el responsable de incrementar la afinidad de la enzima por lípidos aniónicos de membrana. Otro cofactor indispensable para la actividad de todas las isoformas es el fosfolípido ácido fosfatidil-L-serina cuya identidad es selectivamente reconocida por la PKC, al contrario de su enantiómero, la fosfatidil-D-serina, quien no se puede unir a PKC y es incapaz de promover su activación (22).

Los activadores endógenos de la PKC generalmente son de naturaleza lipídica. El más importante, para las PKC convencionales y nuevas, es el 1,2 diacilglicerol (DAG), producto de la degradación del fosfatidil inositol 4, 5 bisfosfato -PIP₂- (figura 4). Otros son el ácido lisofosfatídico, la lisofosfatidilcolina, algunos ácidos grasos cis-insaturados como el araquidónico y el oleico quienes activan a la PKC en presencia de DAG. Se han mencionado a otros lípidos como la ceramida y el fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato (PIP₃) como activadores específicos de las PKC atípicas no dependientes de DAG (7).

Los ésteres de forbol son los compuestos exógenos más comunes para activar a la PKC de modo farmacológico. De este grupo de diterpenos el más utilizado es el TPA, también llamado PMA (forbol miristato-acetato), el cual se aisló del árbol *Croton tiglium* (figura 4). El TPA, cuya actividad es tres órdenes de magnitud mayor a la del DAG, se intercala rápidamente en la membrana y al unirse directamente a la PKC ésta se activa durante tiempos prolongados debido a que el TPA es poco metabolizable por la célula (26). Un activador con una potencia igual o mayor a la del TPA es la briostatina, sustancia derivada de briozoarios marinos. Un rasgo especial de la briostatina, bajo ciertas condiciones, es su capacidad de antagonizar algunos efectos biológicos del TPA. Otros compuestos exógenos análogos son la resiniferotoxina, la mezereína, la timeleatoxina, el ingenol y las DAG-lactonas. Todos ellos activan a la PKC mimetizando bioquímicamente al DAG. Existen agentes activadores con estructura diferente a los ésteres de forbol tales como la teleocidina B-1, la difarnesil-tiotrazol y la aplasiotoxina (27, 28).

Distribución tisular y funciones biológicas de la PKC

Los patrones de distribución de la enzima varían ampliamente en los diferentes tipos celulares. Hasta el momento la expresión predominante en tejidos normales indica que las PKCs se localizan de la

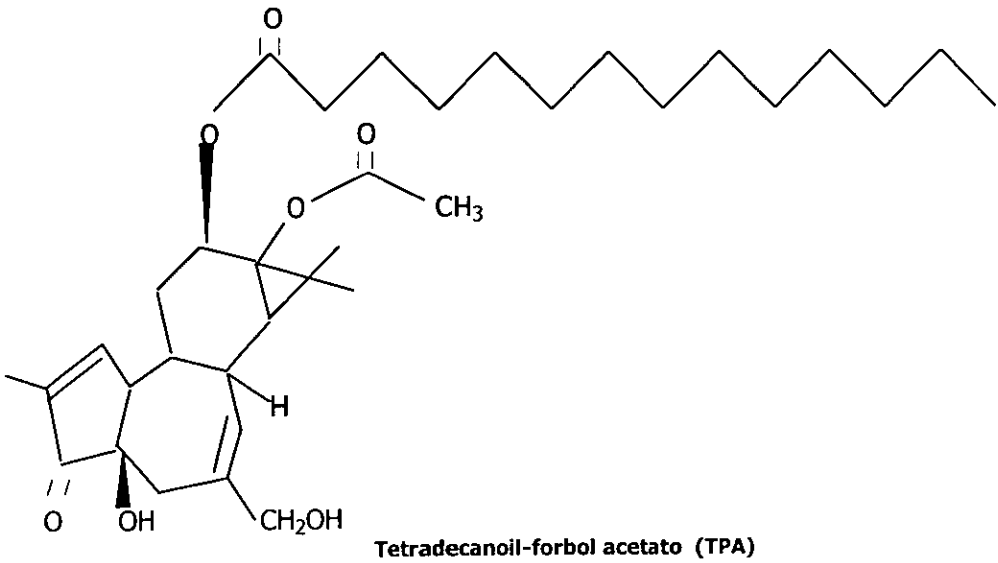
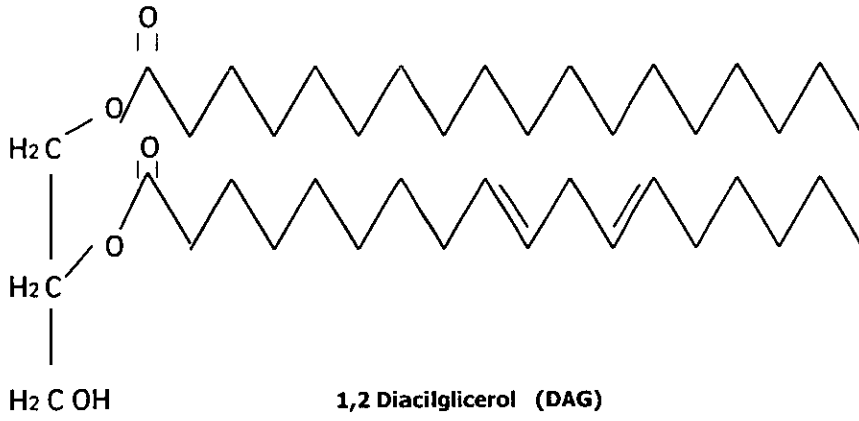


Figura 4.- Estructura química de los principales activadores de la proteína cinasa C

siguiente manera: alfa, delta y zeta son isoformas presentes en todos los tejidos hasta ahora estudiados; beta I y beta II están en cerebro, tejido linfóide, corazón, piel e hígado; epsilon comparte la misma distribución que beta a excepción del tejido linfóide, y además se ha localizado en el pulmón; gamma únicamente se ha detectado en el cerebro; eta se halla en pulmón y piel; theta ubicada en tejido linfóide, músculo y testículos; iota presente en pulmón, cerebro y riñón; mu se expresa en riñón y pulmón (27).

El hecho de que la PKC fosforile y regule a un amplio espectro de proteínas como canales iónicos, proteínas citoesqueléticas y numerosas enzimas, confirma el papel esencial desempeñado por esta cinasa en la fisiología celular. La distribución selectiva de las isozimas de PKC, proporciona una idea aproximada de su función; además, la presencia de varias isoformas en el mismo tejido o célula, sugiere que las PKCs por separado pueden intervenir en distintas actividades celulares. Algunas de las respuestas celulares en donde participa la PKC son: la desensibilización de receptores, la regulación de la transcripción, la mediación de la respuesta inmune, la regulación del crecimiento y proliferación celular, la apoptosis, la memoria, el aprendizaje entre otras más (29).

Los primeros estudios sobre la importancia biológica de la PKC se obtuvieron mediante el uso del activador TPA, aunque la dificultad, todavía vigente, es asignar una respuesta en particular a cada una de las isoformas de PKC debido a que: 1) cada célula por lo general coexpone simultáneamente varias isoformas de PKC, 2) la carencia de inhibidores isozima-específicos y 3) la carencia de activadores isozima-específicos.

Diferentes reportes experimentales sugieren que PKC alfa está involucrada en los contactos célula-célula, en la supresión de la apoptosis y en el nivel de agresividad tumoral en células de mama (30 - 32). La expresión elevada de PKC beta I conduce a la inhibición del crecimiento en células de cáncer de colon HT29 y la supresión del tumor, o por el contrario puede causar la formación de tumores en fibroblastos de rata R6 (33, 34); PKC beta II parece tener un papel en ciertas disfunciones vasculares inducidas por diabetes (35). La isoenzima gamma probablemente actúe en la regulación postsináptica de los receptores de glutamato en varias células del tejido nervioso (36). La isozima delta está implicada en la estimulación del intercambiador membranar de Na^+/H^+ en las células C6 de glioma, en la diferenciación de queratinocitos y en la neuritogénesis inducida por el factor de crecimiento neural (NGF) en células PC12 (37 - 39). PKC delta también puede tener un papel en la muerte celular y en el desarrollo de tumores; se ha reportado en células mieloides leucémicas que la activación de la apoptosis, mediada por $\text{TNF}\alpha$, anti-Fas y radiación, está asociada con la proteólisis de PKC delta efectuada por la cisteína proteasa CPP32 y que los cambios fenotípicos asociados a la apoptosis se deben principalmente a la presencia del fragmento catalítico de esta isoenzima (40). La isoforma eta está involucrada en la diferenciación epitelial (41). PKC theta posiblemente tenga un papel especializado en la señalización de las células T; esta isoenzima también ha sido localizada en el huso mitótico de células murinas

eritroleucémicas, en mieloma P3 y neuroblastoma LAN-5 cuando están en mitosis, lo que sugiere una presunta intervención en el ciclo celular (42). PKC épsilon se ha reportado que actúa como un oncogene cuando está sobreexpresado en fibroblastos, ya que la larga actividad de la enzima conlleva a una transformación neoplásica (43). Su papel oncogénico probablemente se debe a la capacidad de PKC epsilon de activar a Raf-1 en ensayos in vivo e in vitro, y de este modo, intervenir en la vía de las MAP cinasas (44, 45); a épsilon también se le implica en algunos aspectos de la función neural en neuroblastoma humano, en la organización del citoesqueleto y en la estimulación celular vía receptores de insulina (46 - 48). PKC mu probablemente participa en la señalización mediada por el receptor de células B en linfocitos y en la diferenciación de adipocitos (49, 50). Con respecto a PKC zeta y lambda se les ha considerado como mediadores críticos en la vía de la señalización mitogénica mediada por Ras (51, 52). También hay evidencia que indica que zeta y lambda participan en la apoptosis (53, 54), y en otros experimentos se ha observado que la sobreexpresión de PKC zeta incrementa el transporte de glucosa estimulado por insulina (55).

Regulación de la Proteína Cinasa C

La función de la PKC está regulada por dos mecanismos tan importantes como complejos: la activación y la modulación negativa o "down regulation", ambos implicados en la acción catalítica y en el recambio celular de la enzima. Estos procesos intervienen en diversas respuestas fisiológicas.

Activación

Dos fases intervienen en la activación de la PKC: la fosforilación de la enzima para volverse catalíticamente competente y la interacción con los activadores acompañada con la remoción del sitio pseudosustrato del dominio catalítico. La mayoría de esta información se obtuvo por estudios basados en la PKC beta II (24). Primero la PKC recién sintetizada, presente en el retículo endoplásmico y asociada al citoesqueleto, está inactiva y sin fosforilar. Los principales sitios de fosforilación se localizan en tres residuos claves ubicados en el dominio catalítico, regiones C4 y V5 (56).

El primer sitio de fosforilación, Thr 500 (residuo y posición relativa) se localiza en el dominio C4, concretamente en la llamada asa de activación. Esta secuencia se encuentra conservada en todos los subtipos de PKC y su importancia es de tal magnitud que si esta asa tiene mutado al residuo de Thr 500 por un residuo de Ala, la enzima pierde completamente su actividad. El asa de activación es fosforilada por una enzima recién descubierta: PDK-1 (cinasa dependiente de fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato) que probablemente actúa sobre todas las isoformas de PKC (57). La fosforilación por PDK-1 introduce una carga negativa cerca del sitio activo, lo que produce un alineamiento adecuado de los residuos implicados en la catálisis y convierte a la PKC en una enzima catalíticamente competente.

El mecanismo de fosforilación posiblemente no es el mismo para PKC delta. Se ha mostrado en PKC delta que la transfosforilación por PDK-1 en el residuo de treonina homóloga a PKC beta, no es indispensable para volver catalíticamente competente a delta, pues en su lugar un ácido glutámico cercano es capaz de proporcionar la carga negativa necesaria en el asa de activación. Además la mutación de este residuo por valina causa la pérdida de la actividad de cinasa de PKC delta en un 80%. Sin embargo, este resultado no excluye la posibilidad que delta sea modulada también por PDK-1 indicando que esta isoforma pueda ser regulada de manera diferencial (24).

Una vez que esta transfosforilación se lleva a cabo, se presentan dos autofosforilaciones consecutivas en la región V5 (extremo carboxilo) específicamente en los residuos Thr 641 y Ser 660. Ambos residuos modificados interaccionan con el dominio catalítico de tal forma que contribuyen a la estabilidad estructural de una PKC madura, todavía inactiva, para entonces liberada del citoesqueleto al citosol (56) (figura 4).

Además de la fosforilación en residuos de serina y treonina, una isoforma de PKC también se puede fosforilar en tirosina. PKC delta es fosforilada en dicho residuo por tirosina cinasas citoplásmicas como c-Src o C-Fyn en queratinocitos y por Lyn en células leucémicas, cuando se estimula al receptor del factor de crecimiento epidérmico -EGF- (58, 59). Las isoformas restantes muestran poca tendencia para fosforilarse en tirosina. Sin embargo, se desconocen en gran parte las consecuencias de la fosforilación en tirosina en PKC delta.

La siguiente fase de activación ocurre cuando esta forma de PKC fosforilada entra en contacto con sus activadores. El efecto de los activadores contribuye a promover la afinidad de la PKC por los compartimentos membranales, teniendo lugar la translocación de la PKC, es decir, la enzima se redistribuye del citosol hacia las regiones membranales. La translocación posiblemente contribuye a la activación de la cinasa, al acceso a sustratos específicos y a la degradación de la enzima.

Se ha propuesto que el TPA o DAG al unirse a PKC ocupan una cavidad hidrofílica de C1 y la tornan de carácter hidrofóbico, lo cual permite que C1 tenga mayor afinidad por la membrana. De esta forma TPA o DAG actuarían como "ancladores hidrofóbicos" (60). El Ca^{2+} como cofactor incrementa por su parte la afinidad de PKC por lípidos aniónicos -fosfatidilserina- (61). Es posible que tanto el Ca^{2+} como el DAG/TPA actúen como eventos independientes. Respecto a C2 se tiene un modelo en donde esta región se une a membrana a través de residuos cercanos a las asas conformadoras del sitio de unión a calcio, aunque se desconoce el papel que pueda ejercer el catión en esta conexión (50).

La redistribución de la PKC comprende también la interacción de la enzima con la fosfatidil-L-serina, cofactor indispensable para su activación. El sitio de unión específico entre este fosfolípido y la

PKC no se conoce con precisión. Se ha propuesto que la enzima tiende a unirse con varias moléculas de fosfatidilserina y su enlace se establece a través de una interfase producida por la yuxtaposición de las regiones C1 y C2 ya unidas a membrana (62).

Como consecuencia de estas interacciones el sitio pseudosustrato se retira del sitio activo, la PKC adquiere una conformación abierta y la región catalítica es capaz de fosforilar al sustrato (figura 5); además la enzima se pliega de tal forma que su región bisagra (V3) se vuelve lábil a la acción de enzimas como tripsina o proteasas dependientes de Ca^{2+} como la calpaína I y II. La proteólisis limitada de PKC por estas enzimas genera la separación de los dominios regulador y catalítico, este último origina a la PKM que es constitutivamente activa en ensayos *in vitro*. Dicho fragmento puede tener un papel en el control de ciertas funciones celulares (12).

En los últimos tiempos, se ha demostrado que además de los segundos mensajeros lipídicos que regulan la activación y redistribución de la PKC, existen proteínas de anclaje isoenzima-específicas que controlan su actividad y/o localización intracelular. Se han encontrado proteínas adaptadoras que forman complejos multienzimáticos con cinasas y/o fosfatasa que se usan en más de una vía de señalización. La presencia de motivos o módulos en las proteínas hacen posible la interacción específica entre ellas manteniéndolas en sitios específicos en los que sólo tienen acceso a sustratos localizados en ese lugar. Por tanto, la localización precisa de cada isoforma de PKC parece ser crítica para su función. Además, la intercomunicación entre diferentes rutas de transducción de señales que comparten cinasas y/o fosfatasa, hace que sea particularmente crítica para la célula la localización precisa de éstas para evitar una intercomunicación necesaria.

Evidencias anteriores habían mostrado que cuando se activa la PKC se asocia con proteínas de la fracción particulada, probablemente del citoesqueleto, así como con proteínas nucleares. Se ha postulado que un grupo de de estas proteínas puede actuar como receptores específicos para la forma activada de PKC (denominados RACKs por Receptor for Activated C Kinase) cuya unión fosfolípido-dependiente pueda servir para estabilizar la asociación de la enzima activa con sitios específicos en la membrana. Se han identificado 3 RACKs putativas en membranas de cerebro y de corazón de rata (63, 64). También se ha descubierto recientemente otra proteína similar, RACK 2 que se une específicamente con épsilon (65) y se ha detectado que otras moléculas establecen contacto con las restantes isoformas (66). Una de estas moléculas que interactúan con PKC pertenece a las AKAPs (proteínas ancladoras de PKA). Una proteína de esta familia AKAP 79 (peso molecular de 79 KDa) es capaz de anclar PKC convencionales. Además se ha descubierto un oligopéptido básico en AKAP 79 que puede inhibir la actividad de PKC *in vitro*. Esto indicaría que las PKC unidas a AKAP 79 permanecen inactivas (67). Otras estructuras descubiertas son proteínas de anclaje específicas para PKC zeta y lambda, ZIP y LIP respectivamente (68, 69). Los mecanismos moleculares de la redistribución relacionados con este tema no se conocen completamente, por ejemplo se ignora la manera en que las proteínas de anclaje pudieran intervenir en la translocación de la PKC.

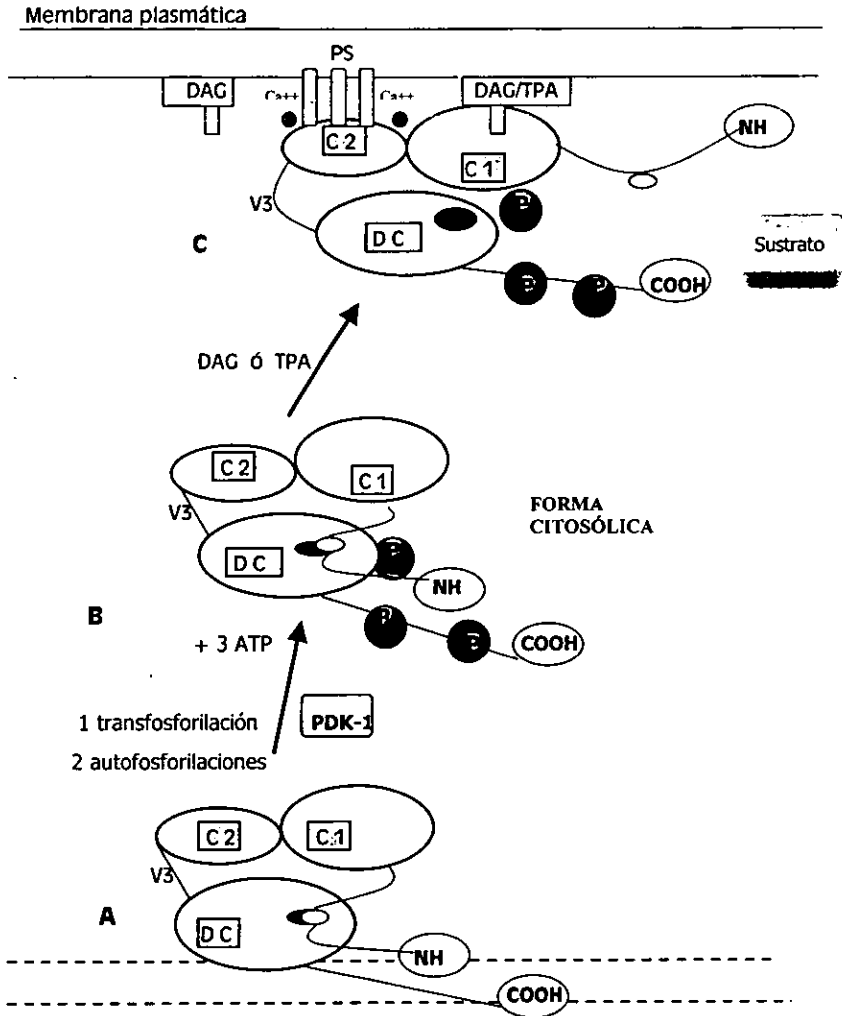


Figura 5.- Activación de la PKC. Se muestra la activación de una PKC convencional. **C1**: región C1, **C2**: región C2, óvalo blanco pequeño: segmento pseudosustrato, **V3**: región bisagra, **DC**: dominio catalítico, óvalo negro pequeño: sitio activo, **DAG**: diacilglicerol, **TPA**: tetradecanoil forbolacetato, **PS**: fosfatidilserina, **PDK-1**: cinasa dependiente de fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato, Círculos negros: calcio, círculos grises: grupos fosfato (P). En **A** la PKC recién sintetizada carece de fosfatos y el pseudosustrato cubre al sitio activo. En **B** PDK-1 fosforila a PKC en el asa de activación y enseguida se presentan dos autofosforilaciones en el extremo carboxilo. En **C** los activadores de PKC hacen contacto con la enzima y producen un cambio conformacional de modo que se libera el sitio activo, la cinasa es capaz de actuar sobre el sustrato y por su parte V3 se expone y es susceptible a enzimas proteolíticas.

Modulación negativa

El otro mecanismo regulador de la PKC es el fenómeno conocido como "down-regulation" o modulación negativa, que en conjunto comprende la inactivación catalítica y la posterior degradación proteolítica de la enzima. Ciertas evidencias sobre la modulación negativa de la PKC han señalado que la exposición prolongada con TPA en células de glioma de rata, causan la desaparición de la enzima debido principalmente a un incremento en su tasa de degradación y no a una baja en su tasa de síntesis proteica o de RNA mensajero; esto mismo se ha observado en fibroblastos y melanocitos murinos y en varias líneas celulares (70, 71). Sin embargo, en sistemas como células B de linfoma murino A20 tratadas con TPA, la PKC delta es modulada negativamente de tal forma que los mecanismos involucrados comprenden un descenso en la tasa de transcripción y un incremento en la tasa de degradación del ARN mensajero de la PKC delta (72). El DAG también causa modulación negativa de la PKC: en células GH4C1, PKC épsilon desaparece después de la producción de DAG por 12 horas. Altos niveles de este lípido modulan negativamente de modo selectivo a PKC alfa y épsilon en células inducidas de forma sostenida con PDGF y bombesina (7).

Se ha reportado ampliamente en diversos linajes celulares, la acción del TPA y DAG sobre la PKC durante tratamientos prolongados. La modulación negativa inducida por estos agentes en la PKC se ha presentado desde las 12 hasta las 72 horas de tratamiento dependiendo del tipo celular (70, 73). Según lo anterior la modulación negativa de la PKC se presenta cuando la exposición al TPA es por lapsos prolongados de tiempo, además este procedimiento se ha utilizado comúnmente como una forma de inducir la "down-regulation" en la PKC en una amplia variedad de células. La detección de la PKC mediante anticuerpos isozima-específicos, ha revelado la desaparición total de la enzima en dichos periodos de tiempo, antecedida por un descenso en la actividad enzimática de la PKC. Al parecer existe una correlación entre la activación sostenida de la PKC y su desaparición.

Por otra parte se han mostrado evidencias experimentales que señalan claramente la presencia de la modulación negativa de la PKC cuando se incuba con TPA en periodos cortos de tiempo. De acuerdo a esto se ha mostrado que la PKC tratada con TPA durante 5 a 15 minutos pierde su actividad de manera selectiva, es decir, la tasa de descenso en la actividad enzimática es diferente para cada isoforma. En algunas la caída es evidente y en otras la pérdida no es significativa como se ha reportado en células leucémicas humanas KM3, en fibroblastos Rat-1 y en hepatocitos de rata (74-76). Sin embargo el hecho de que, a periodos cortos de tiempo, la pérdida de actividad de la PKC, inducida por TPA, sea isoenzima-selectiva, no ha podido ser explicada en su base molecular. Hasta el momento no se conocen los mecanismos responsables de esta pérdida de actividad diferencial en la PKC, ni el papel que desempeña el TPA en la desactivación de la enzima.

Diferentes grupos han reportado que la modulación negativa de la PKC es variable según el estímulo aplicado y la isoforma involucrada. En células GH4C1, la PKC alfa no presenta "down-regulation" cuando es tratada con TPA o TRH (hormona liberadora de tirotrópina), mientras que en otras células, PKC alfa desaparece después de aplicar TPA. En la misma línea celular la modulación negativa de PKC beta II se indujo con TPA, no así cuando se añadió la TRH (77, 78). Con respecto a épsilon, se ha encontrado que el tratamiento prolongado con TPA no produce la desaparición de la cinasa en células U937 y ni en timocitos y, contrariamente a alfa y beta II, épsilon se modula negativamente en células GH4C1 bajo la acción de TPA y TRH (79). Por otra parte, se ha reportado que PKC zeta es sensible a la "down-regulation" con PMA en fibroblastos rat 6 y en plaquetas humanas, y en cambio, zeta no la manifiesta en células HL60 y ni en células renales mesangiales (80 - 83).

La inducción de la modulación negativa de la PKC parece ser una consecuencia de su activación y probablemente el aumento de su proteólisis refleja: a) la activación de una proteasa, b) una modificación conformacional en la PKC que la haga susceptible a la acción de la misma o bien una combinación de ambos procesos. Previamente se propuso que, a consecuencia de la activación, la autofosforilación de PKC pudiera anteceder a la "down-regulation" (84); sin embargo, esto es improbable debido a que en experimentos con una PKC alfa mutada, deficiente en su actividad de cinasa, el tratamiento con TPA produjo la desaparición de la enzima, lo que sugiere que la inactivación de la PKC puede anteceder a la acción de la proteasa (85).

Diversos trabajos con mutagénesis dirigida demostraron que la desfosforilación parcial de la PKC predispone a la proteína a la modulación negativa debido a una pérdida en la estabilidad molecular que la vuelve inactiva y la hace sensible a la acción de fosfatasas y de agentes oxidantes (86). Incluso se ha reportado en células COS, tratadas con TPA, que la PKC alfa se desfosforila debido a la posible intervención de una fosfatasa tipo 2A asociada a membrana (87). Por tanto, una propuesta apoyada con numerosos experimentos, señala que la inactivación de la PKC se debe principalmente a la desfosforilación de la enzima. Además la aplicación de ácido okadaico, un inhibidor potente de fosfatasas, en células PC12 incubadas con TPA, protege parcialmente a la PKC de la modulación negativa señalando el papel que tendría la desfosforilación en la fase inicial de este fenómeno (88).

Con respecto a la identificación de la proteasa responsable de la degradación de la PKC, se ha postulado la acción de tres mecanismos, uno de ellos lo relaciona con la presencia de fenómenos de tráfico vesicular; otro menciona la participación de proteasas neutras conocidas como calpaínas y un tercero propone la acción del sistema degradador de proteínas ubiquitina-proteosoma. Esta última hipótesis ha recibido un considerable respaldo experimental.

Según la primera hipótesis, en estudios de PKC de mamíferos expresada en *Schizosaccharomyces pombe*, se ha podido observar la acumulación de vesículas intracelulares al tratar con TPA a las células del hongo transfectadas con las isoformas zeta y delta. Debido a que las PKC

activadas se asocian a membranas, se propone que la actividad incrementada de la endocitosis, elevaría el tráfico vesicular desde y hacia la membrana plasmática. Durante este proceso, las PKC son dirigidas a su degradación en los lisosomas o por la acción de proteosomas (89). Hasta la fecha esta propuesta no ha sido corroborada por otros investigadores.

Por otra parte la calpaína es una cisteína proteasa dependiente de ión Ca^{2+} presente en gran variedad de células y tejidos (90). Se ha observado en neutrófilos y en miocitos tratados con TPA, la translocación de la calpaína a la membrana, semejante a lo que ocurre con la PKC, de tal suerte que la calpaína pudiera proteolizar a la PKC en este mismo compartimiento (91, 92). Además la aplicación de inhibidores de calpaína (leupeptina, calpastatina e inhibidores I y II) impiden la degradación de varias isoformas de PKC (93, 94). En el mismo sentido, la aplicación del ionóforo de Ca^{2+} A23187 incrementa la proteólisis de la enzima inducida por TPA en cultivos primarios de hepatocitos (93) apoyando una presunta correlación de iones Ca^{2+} y activación de calpaína, lo que sugiere la importancia de esta proteasa en la "down-regulation" de las PKC. Sin embargo se ha observado que los inhibidores I y II de calpaína no impiden la "down-regulation" de las isoformas alfa y épsilon inducidas por briostatina en fibroblastos humanos (95). Se sabe que el inhibidor I de la calpaína también tiene propiedades inhibitorias moderadas hacia el proteosoma 26S, incluso un tipo de calpastatina inhibe la degradación de Mos, una proteína que es fragmentada por el sistema ubiquitina-proteosoma (96). Es posible que la modulación negativa de la PKC pueda ocurrir de manera independiente vía calpaína y ubiquitina.

Recientemente, la hipótesis del sistema ubiquitina-proteosoma como responsable de la degradación de la PKC, ha sido respaldada experimentalmente. En células epiteliales renales, fibroblastos humanos y células Rat 3Y1 se ha comprobado que distintas isoformas de PKC se ubiquitinan en respuesta al tratamiento con TPA, briostatina e incluso diacilglicerol (71, 95, 97). En el caso de PKC alfa y épsilon, tratadas con briostatina, la aplicación de un inhibidor selectivo del proteosoma (lactacistina) impide la desaparición de estas isoformas e incluso preserva su actividad de cinasa en ensayos in vivo. Además la briostatina produce formas no fosforiladas de PKC alfa y épsilon lo cual posiblemente las predisponga a la ubiquitinación (95). Lo anterior señala que la desfosforilación podría ser un paso previo para la degradación de la PKC. En otro reporte se demuestra la necesidad de que la PKC se encuentre activada para desencadenar su ubiquitinación (97).

Probablemente la proteasa que degrada a la PKC pueda ser tanto calpaína o el sistema ubiquitina-proteosoma u otra enzima no determinada y/o que la participación relativa de estos dos sistemas proteolíticos varíe según el tipo celular y/o las isoformas de PKC que se encuentren activadas.

JUSTIFICACION

Los aspectos moleculares de la modulación negativa de la PKC después de ser activada hasta el momento son poco claros. La investigación se enfocó a estudiar algunos fenómenos bioquímicos relacionados a la modulación negativa que ocurren después de activar a la PKC con epinefrina o TPA durante breves periodos de tiempo.

HIPOTESIS

La activación de la PKC por breves lapsos de tiempo, ya sea con TPA o con epinefrina, producirá cambios diferenciales en la localización y en la modulación negativa de las isoenzimas de PKC probablemente por la inducción de cambios en su estado de fosforilación.

OBJETIVOS

El objetivo fundamental de esta tesis fue el de investigar cuál es la base molecular de la modulación negativa de las distintas isoenzimas de proteína cinasa C como resultado de su activación.

Para este fin se estudiaron los efectos que se producen en la enzima al activarla de manera natural con la hormona epinefrina a través de receptores α_1 adrenérgicos, y de manera directa con el éster de forbol TPA.

Se evaluó la modulación negativa estudiando los siguientes parámetros que se desglosan en el diagrama de la figura 6.

A. DETECCION INMUNOLOGICA DE LAS ISOENZIMAS DE PKC EN HEPATOCITOS DE RATA

Se efectuó la purificación parcial de las diferentes isoformas de PKC que se expresan en los hepatocitos de rata, bajo las condiciones mencionadas en los materiales y métodos y se analizaron por ensayos de inmunotransferencia.

B. REDISTRIBUCION (TRANSLOCACION)

Se examinaron los cambios producidos en la localización celular de las isoformas de PKC como resultado de su activación, analizando las diferentes fracciones celulares por "Western blot".

C. ACTIVIDAD DE LA PKC

Se analizaron los cambios en la actividad enzimática de las diferentes isoformas de PKC in vitro después del tratamiento con TPA y epinefrina, en presencia o en ausencia de inhibidores de fosfatasa.

JUSTIFICACION

Los aspectos moleculares de la modulación negativa de la PKC después de ser activada hasta el momento son poco claros. La investigación se enfocó a estudiar algunos fenómenos bioquímicos relacionados a la modulación negativa que ocurren después de activar a la PKC con epinefrina o TPA durante breves periodos de tiempo.

HIPOTESIS

La activación de la PKC por breves lapsos de tiempo, ya sea con TPA o con epinefrina, producirá cambios diferenciales en la localización y en la modulación negativa de las isoenzimas de PKC probablemente por la inducción de cambios en su estado de fosforilación.

OBJETIVOS

El objetivo fundamental de esta tesis fue el de investigar cuál es la base molecular de la modulación negativa de las distintas isoenzimas de proteína cinasa C como resultado de su activación.

Para este fin se estudiaron los efectos que se producen en la enzima al activarla de manera natural con la hormona epinefrina a través de receptores $\alpha 1$ adrenérgicos, y de manera directa con el éster de forbol TPA.

Se evaluó la modulación negativa estudiando los siguientes parámetros que se desglosan en el diagrama de la figura 6.

A. DETECCION INMUNOLOGICA DE LAS ISOENZIMAS DE PKC EN HEPATOCITOS DE RATA

Se efectuó la purificación parcial de las diferentes isoformas de PKC que se expresan en los hepatocitos de rata, bajo las condiciones mencionadas en los materiales y métodos y se analizaron por ensayos de inmunotransferencia.

B. REDISTRIBUCION (TRANSLOCACION)

Se examinaron los cambios producidos en la localización celular de las isoformas de PKC como resultado de su activación, analizando las diferentes fracciones celulares por "Western blot".

C. ACTIVIDAD DE LA PKC

Se analizaron los cambios en la actividad enzimática de las diferentes isoformas de PKC in vitro después del tratamiento con TPA y epinefrina, en presencia o en ausencia de inhibidores de fosfatasa.

JUSTIFICACION

Los aspectos moleculares de la modulación negativa de la PKC después de ser activada hasta el momento son poco claros. La investigación se enfocó a estudiar algunos fenómenos bioquímicos relacionados a la modulación negativa que ocurren después de activar a la PKC con epinefrina o TPA durante breves periodos de tiempo.

HIPOTESIS

La activación de la PKC por breves lapsos de tiempo, ya sea con TPA o con epinefrina, producirá cambios diferenciales en la localización y en la modulación negativa de las isoenzimas de PKC probablemente por la inducción de cambios en su estado de fosforilación.

OBJETIVOS

El objetivo fundamental de esta tesis fue el de investigar cuál es la base molecular de la modulación negativa de las distintas isoenzimas de proteína cinasa C como resultado de su activación.

Para este fin se estudiaron los efectos que se producen en la enzima al activarla de manera natural con la hormona epinefrina a través de receptores α_1 adrenérgicos, y de manera directa con el éster de forbol TPA.

Se evaluó la modulación negativa estudiando los siguientes parámetros que se desglosan en el diagrama de la figura 6.

A. DETECCION INMUNOLOGICA DE LAS ISOENZIMAS DE PKC EN HEPATOCITOS DE RATA

Se efectuó la purificación parcial de las diferentes isoformas de PKC que se expresan en los hepatocitos de rata, bajo las condiciones mencionadas en los materiales y métodos y se analizaron por ensayos de inmunotransferencia.

B. REDISTRIBUCION (TRANSLOCACION)

Se examinaron los cambios producidos en la localización celular de las isoformas de PKC como resultado de su activación, analizando las diferentes fracciones celulares por "Western blot".

C. ACTIVIDAD DE LA PKC

Se analizaron los cambios en la actividad enzimática de las diferentes isoformas de PKC in vitro después del tratamiento con TPA y epinefrina, en presencia o en ausencia de inhibidores de fosfatasa.

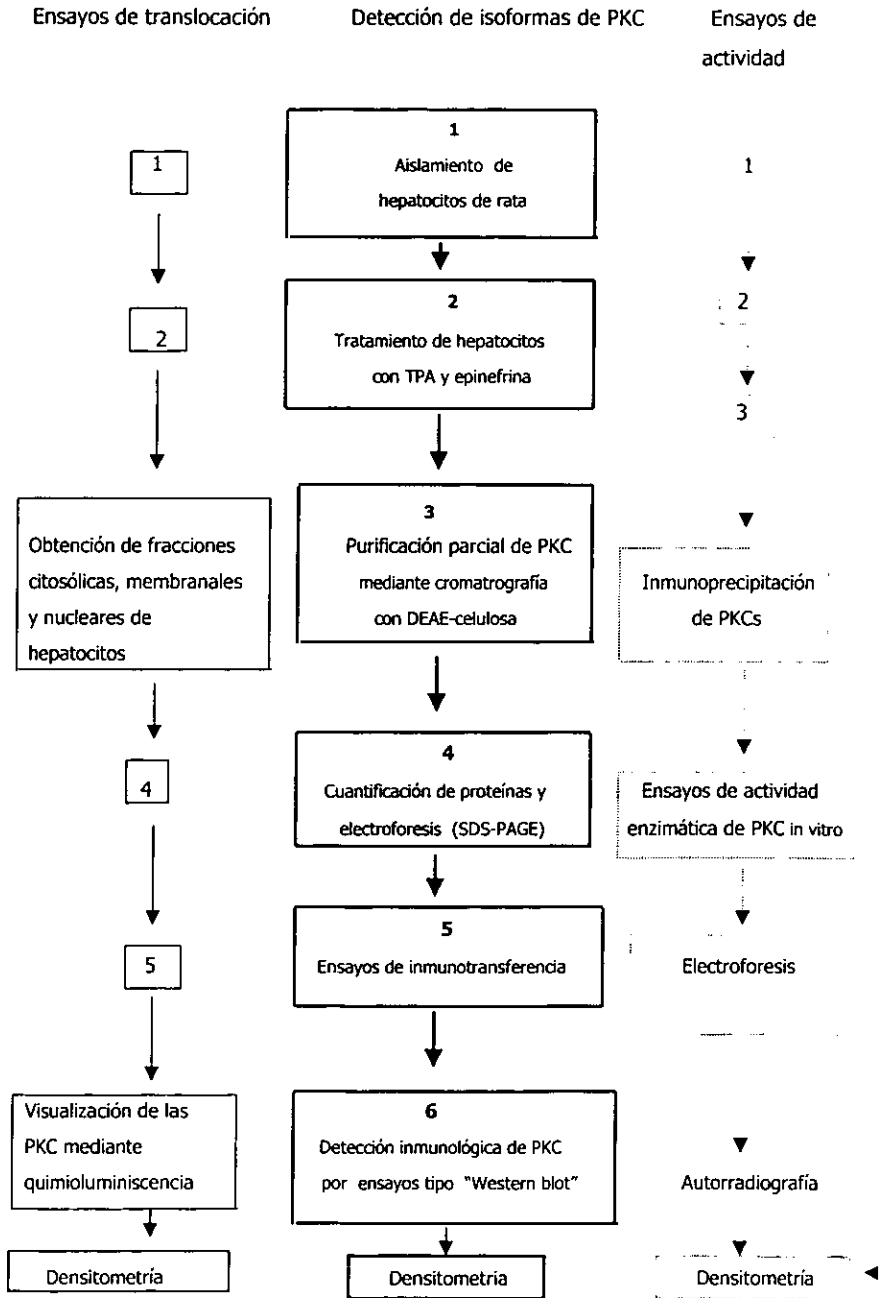


Figura 6.- Diagrama de los procedimientos experimentales usados para el estudio de la modulación negativa de la PKC en hepatocitos de rata.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Aislamiento de hepatocitos de rata

Se utilizó como modelo experimental a los hepatocitos de rata, cepa Wistar, aislados en fresco mediante el método de perfusión con colagenasa, descrito por Berry y Friend (98).

Se usaron ratas Wistar sin importar su sexo, con un peso de 250 a 300 gramos. Se extrajeron los hígados completos y se lavaron, vía vena porta, con amortiguador **Krebs-Ringer** a pH 7.35 a 37 °C, en un ambiente saturado con O₂/CO₂ (5%/95%), hasta eliminar los residuos y coágulos sanguíneos. Se perfundió el hígado con amortiguador **Krebs-Ringer** + CaCl₂ 1.27 mM, se disolvió colagenasa tipo II (215 U/mg) en este amortiguador y se dejó que la solución recirculara 15 o 20 minutos hasta ablandar el tejido, después de lo cual se disgregó cuidadosamente en presencia de amortiguador **Krebs-Ringer** + CaCl₂ hasta obtener una suspensión homogénea. Se filtró la suspensión, se centrifugó tres veces a 4000 rpm por un minuto. Se tomó una alícuota para verificar al microscopio óptico la viabilidad celular, mediante la técnica de tinción con azul de Tripán al 0.04 % en amortiguador **Krebs-Ringer**. La viabilidad mínima que se empleó fue del 75%.

Solución **Krebs-Ringer**.

NaCl 120 mM, KCl 4.75 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM MgSO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 24 mM y Glucosa 10 mM.

Tratamiento de hepatocitos con activadores de PKC

Los hepatocitos recién aislados y viables, se llevaron a una concentración de 150 a 200 mg/ml de peso fresco en solución **Krebs-Ringer** + CaCl₂ 1.27 mM y se dividieron en tres lotes: 1) Control, el cual se incubó sin activadores, sólo con el vehículo dimetil formamida (DMF). 2) Estimulación farmacológica de PKC con TPA 10⁻⁶ M disuelto en DMF (dimetil formamida). 3) Estimulación de PKC a través de receptores α 1 adrenérgicos. Se le añadió epinefrina 10⁻⁵ M + propanolol 10⁻⁵ M; el propanolol se agregó para bloquear los receptores β -adrenérgicos, que también se expresan en hepatocitos, y de esta manera, la epinefrina contacta solamente con los receptores α 1-adrenérgicos que están acoplados a la activación de la PKC (1). La incubación simultánea de los tres lotes se efectuó en baño con agitación a 37°C durante 5 minutos.

Purificación parcial de isoformas de PKC por cromatografía de intercambio iónico con DEAE-celulosa

Se tomaron el lote control y el tratado con TPA 10^{-6} M para resuspenderlos en **amortiguador de homogenización** con Tritón X-100 al 0.5% y homogenizarlos en frío. Todos los pasos siguientes se realizaron a 4°C. Después de 30 minutos de incubación en hielo, se centrifugaron a 15000 rpm por 20 minutos. Para cada lote se tomó un alícuota de los sobrenadantes (extracto crudo) y se diluyó en **amortiguador de lavado** a una proporción 1 : 4.

En seguida se añadieron las muestras de extracto crudo a las columnas, cargadas con 1 ml de DEAE-celulosa, previamente equilibradas a pH 7.5, y a continuación se agregaron 8 ml de **amortiguador de lavado** por columna. Las columnas se trataron con 8 ml de **amortiguador de elución I** y los eluidos recolectados se denominaron PKC I; en seguida se agregaron 4 ml de **amortiguador de elución II**, el cual produjo los eluidos PKC II. En estudios previos (76) se encontró que los eluidos PKC I y PKC II poseen actividad de cinasa en ensayos de actividad in vitro, además se detectó la presencia de las isoformas alfa y beta en PKC I por inmunoensayos tipo Western Blot. Mediante esta purificación parcial se detectaron las isoenzimas de PKC existentes en hepatocitos de rata.

Detección de las isoformas eluidas

Ambos extractos de PKC I y PKC II se concentraron por separado a mediante ultrafiltración con membranas de Amicon YM30 en 1 ml. Se tomaron alícuotas de cada concentrado, se cuantificaron las proteínas por la técnica de Bradford y se separaron mediante SDS-PAGE al 10%. Más tarde se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se analizaron con anticuerpo isoenzima-específico y se revelaron con un segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano.

Amortiguador de homogenización

Tris 20 mM, EDTA 2 mM, EGTA 10 mM a pH 7.5, inhibidor de tripsina 0.1 mg /ml, PMSF 1 mM, leupeptina 1 μ M y β -mercaptoetanol 50 mM.

Amortiguador de lavado

Tris 20 mM y β -mercaptoetanol 50 mM a pH 7.5

Amortiguador de elución I

Tris 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 0.08 M, β -mercaptoetanol 50 mM e inhibidor de tripsina 0.1 mg/ml a pH 7.5.

Amortiguador de elución II

Tris 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 0.25 M, β -mercaptoetanol 50 mM e inhibidor de tripsina 0.1mg/ml a pH 7.5

Separación de las fracciones citosólicas, membranales y nucleares de los hepatocitos

Después de lavar las muestras de los tres lotes de hepatocitos con amortiguador **Ringer-Krebs + CaCl₂ 1.2 mM** por centrifugación a 4000 rpm por 1 minuto, se separaron las fracciones celulares de la siguiente forma:

A.- Citosol y membranas. Las muestras se lisaron en **amortiguador de homogenización -sin Tritón-** y se centrifugaron a 15000 rpm (20 000 g) por 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes correspondieron a la parte citosólica, mientras que los precipitados se rehomogenizaron con el **amortiguador de homogenización** con la adición de Tritón X-100 al 0.5 %. A continuación, se incubaron en hielo por 30 minutos y se centrifugaron a 15000 rpm por 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes producidos son la fracción particulada soluble en detergente (membrana plasmática) y los precipitados corresponden a la fracción particulada insoluble en detergente (citoesqueleto).

B.- Núcleos: Los hepatocitos (150mg/ml de peso fresco) se resuspendieron en **amortiguador de lisis** en vortex por 30 segundos y se centrifugaron a 4000 rpm por 1 minuto y el precipitado se resuspendió en el mismo amortiguador; los pasos anteriores se repitieron por tres ocasiones, desechando el sobrenadante. Al pellet final, consistente en núcleos aislados de hepatocitos, se le agregó **amortiguador de homogenización** con Tritón X-100 al 0.5% y se agitó en vortex por 30 segundos. La solución resultante se utilizó como extracto nuclear.

Amortiguador de homogenización

Tris 20 mM, EDTA 2 mM, EGTA 10 mM a pH 7.5, inhibidor de tripsina 0.1 mg /ml, PMSF 1 mM, leupeptina 1 μ M y β -mercaptoetanol 50 mM.

Amortiguador de lisis

Tris-HCl pH 7.4, NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM y Nonidet P-40 0.5 %.

Cuantificación y separación de proteínas.

Se determinó la cantidad de proteína en cada lote según el método de Bradford utilizando a la gama globulina de plasma bovino como estándar. Se tomaron 100 μg de proteína de cada fracción celular y se les añadió **solución digestora de Laemmli** (4% SDS, 20% glicerol, 10% de β -mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8). Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS (SDS-PAGE) según Laemmli (99).

Ensayos de inmunotransferencia para la detección de PKC.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se trataron con leche desgrasada al 5% en **TBS 1X** por una hora, para bloquear las interacciones inespecíficas. Más tarde se incubaron las membranas en agitación con anticuerpos mono y policlonales específicos para isoformas de PKC, (disueltos en TTBS) durante toda la noche a 4 °C. Las membranas se lavaron tres veces con **TTBS** y se hizo una segunda incubación por dos horas con anti IgG de ratón (si se usó el anticuerpo monoclonal) o de conejo (si se usó el anticuerpo policlonal) acoplados a fosfatasa alcalina. En seguida estas membranas se lavaron de nuevo tres veces con **TTBS**, una vez con **TBS 1X** y se incubaron en una solución con un sustrato específico para fosfatasa alcalina, el cual después de reaccionar con la enzima, emite una señal luminiscente que se puede imprimir en una placa fotográfica. Las manchas representan a la PKC detectada las cuales sirven para obtener valores cuantitativos a través de análisis densitométricos realizados por el programa de análisis de imágenes "Quantity one" de Bio-Rad laboratories.

TBS

Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5

TTBS

TBS + Tween 20 al 0.2%

Anticuerpos antiPKC :

Santa Cruz Biotechnology. Policlonal. Reconoce el extremo carboxilo del dominio catalítico: α , β , δ , μ , θ , ζ

Seikagaku laboratories. Monoclonal. Reconoce el dominio regulatorio: β , γ

Calbiochem. Policlonal. Reconoce el extremo carboxilo del dominio catalítico: α , δ , ϵ , η , ζ

Transduction labs. Monoclonal. Reconoce el dominio regulatorio: μ , θ .

Gibco. Policlonal. Reconoce la región V3: α , β , γ . Reconoce el extremo carboxilo del dominio catalítico: δ , ϵ , η , ζ .

Up-state biotechnology. Policlonal. Reconoce el extremo carboxilo de PKC alfa particularmente a la serina 657 fosforilada.

Medición de la actividad de PKC en inmunoprecipitados

Previo a los ensayos de actividad, los extractos crudos de hepatocitos se homogenizaron en ausencia o presencia de una mezcla de **inhibidores de fosfatasas**, los cuales también estuvieron ausentes o presentes, durante la purificación de la PKC I y PKC II con DEAE celulosa. Los lavados y las eluciones se realizaron sin β -mercaptoetanol.

a) Inmunoprecipitación de las isoformas de PKC a partir de los eluidos obtenidos de la cromatografía con DEAE-celulosa.

Los concentrados de 1 ml de PKC I, correspondiente a cada tratamiento, se incubaron por separado con anti PKC (1 μ g/ml) correspondiente a cada isoforma por 1 hora a 4 °C en agitación constante. En seguida se añadieron 20 μ l de una suspensión de proteína A agarosa al 50 % y se incubó por dos horas bajo las condiciones anteriores. Más tarde las muestras se lavaron por centrifugación por tres ocasiones a 9000 rpm por 1 minuto a 4°C en presencia de **amortiguador de inmunoprecipitación** al cual se le añadió Nonidet P-40 al 0.5%.

b) Ensayo de actividad de PKC.

Se incubaron los inmunoprecipitados por 20 minutos con " **buffer K** " (sin ATP frío, es decir, no radiactivo) a 4°C y se centrifugaron de nuevo para retirar el " **buffer K** " cuidadosamente sin tocar el "pellet". A cada muestra se le agregaron 50 μ l de **mezcla de reacción** incubándose con agitación a 30°C durante 15 minutos; en dicha **mezcla de reacción** la PKC inmunoprecipitada efectúa la fosforilación del sustrato (histona) añadiéndole fosfato radiactivo del [γ^{32} P] ATP. La reacción se detuvo con la adición de 50 μ l de **solución digestora de Laemmli**. Las muestras, hervidas y centrifugadas, se separaron en SDS-PAGE al 12.5%, se tiñó el gel con una solución de metanol al 25%, ácido acético al 10% y azul de Coomassie al 0.25%. En seguida se destiñó el gel con una solución de metanol al 25% y ácido acético al 10%. El gel se recubrió con celofán, se secó por calor y finalmente se expuso para autorradiografía a -70 °C.

Amortiguador de inmunoprecipitación

Tris 50 mM, NaCl 0.6 M, pH 8.3, inhibidor de tripsina 0.1 mg/ml, tritón X-100 1%.

Buffer K

Tris 20 mM, MgCl₂ 10 mM, ATP 20 mM, CaCl₂ 0.5 mM, β -mercaptoetanol 50 mM

Mezcla de Reacción

"Buffer K" adicionado con 10 μ M [γ^{32} P] ATP (6000 Ci/mmol), Histona 200 μ g/ml, fosfatidilserina 20 μ g/ml, y 1,2 dioleína 0.8 μ g/ml.

Mezcla de inhibidores de fosfatasas

Pirofosfato de sodio 10 mM, NaF 11mM, Na₃VO₄ 1mM, fosfoserina 0.2 mg/ml, β-glicerofosfato 10 mM

Análisis estadístico

Los resultados de las gráficas son valores medios obtenidos de 3 a 4 experimentos independientes. Las diferencias entre los valores medios fueron comparados con el método de ANOVA de una cola, en donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Isoformas de PKC que se expresan en los hepatocitos de rata.

Con el propósito de averiguar cuáles son las isoenzimas de PKC que se expresan en los hepatocitos, se realizó una purificación parcial de ellas mediante cromatografía en DEAE-celulosa. Las células se aislaron de tejido hepático fresco a través del método de perfusión de Berry y Friend (98); los hepatocitos se incubaron *in vivo* en presencia o en ausencia de TPA $1 \mu\text{M}$ a 37°C durante 5 minutos. Se obtuvieron extractos celulares solubles en detergente como se menciona en los procedimientos experimentales. Dichos extractos se añadieron a una columna cromatográfica con DEAE-celulosa. Utilizando amortiguadores con diferente fuerza iónica, se obtuvieron dos picos de elución llamados PKC 1 y PKC 2 en condiciones control y con TPA. Se cuantificaron las proteínas de PKC 1 y PKC 2 con el método de Bradford, utilizándose $100 \mu\text{g}$ de proteína por muestra para separarse en SDS-PAGE y analizarse en ensayos de inmunotransferencia para detectar la presencia de los distintos tipos de PKC usando anticuerpos isoenzima específicos (ver procedimientos experimentales).

Un procedimiento similar se ha utilizado en hepatocitos de rata para demostrar la expresión y la actividad catalítica de las isoformas alfa y beta (76); incluso se ha reportado la presencia de epsilon, delta y zeta en las mismas células (7). Los experimentos realizados en el presente trabajo y en nuestro laboratorio, han confirmado que también se expresan otras dos isoenzimas: theta y mu (66). Esto nos indica que en los hepatocitos de rata se coexpresan al menos siete isoformas de PKC: alfa y beta (convencionales); delta, epsilon, theta y mu (nuevas) y zeta (atípicas). Las isoenzimas eta y gamma no se detectaron experimentalmente, por lo que es probable que no se expresen en hepatocitos y hasta la fecha no hay reportes que indiquen lo contrario.

La expresión de las isoformas en hepatocitos se detectó con el uso de dos tipos diferentes de anticuerpos anti-PKC para cada isotipo. Este procedimiento se utilizó con base en un reporte que señalaba que para PKC mu se presentaba el hecho de que un anticuerpo detectaba la presencia de la enzima, mientras que usando otro anticuerpo de diferente casa comercial no se lograba ubicar ninguna señal, lo que resultaba en una modulación negativa aparente (111). De los dos tipos de anticuerpos usados se seleccionaron aquellos que detectaron mejor la expresión de las isoformas y revelaban a su vez la presencia de la modulación negativa de modo más confiable. La mayoría de las isoenzimas se detectaron con el uso de un anticuerpo dirigido contra el fragmento carboxilo terminal. Respecto a su ubicación en los eluidos cromatográficos, las isoenzimas alfa, delta, theta, zeta y mu se localizaron en ambos picos de elución (PKC1 y PKC2) en tanto beta y epsilon únicamente se encontraron en el pico PKC 1 (figura 7A).

Se ha reportado en varios tipos celulares, que la PKC tratada con TPA por tiempo prolongado (más de 12 horas o incluso días) produce la pérdida de la detección de la enzima por degradación proteolítica denominada como "down-regulation" o modulación negativa (70, 71). También se ha descrito que este fenómeno, en ciertas isoformas de PKC, puede ocurrir en cuestión de minutos (74 -76). Uno de los objetivos de este trabajo consiste en investigar cuales son las isoformas de la PKC, expresadas en hepatocitos de rata, susceptibles de experimentar modulación negativa como consecuencia de incubarlas con TPA por cinco minutos.

A continuación se enumeran las isoformas de PKC encontradas en los picos 1 y 2, tratadas o no con TPA, y si presentan modulación negativa mediante el análisis por "Western blot". (figura 7A)

PKC alfa. Peso molecular (PM): 82 KDa.

Se puede observar que en el pico 1, PKC alfa experimentó la modulación negativa cuando se incubó con TPA, mientras que en el pico 2 no se detectó pérdida de la señal con el mismo tratamiento. En ambos picos se reveló la expresión de alfa como un doblete de 80 y 90 KDa.

PKC beta PM: 80 KDa.

Esta isoforma sólo se localizó en el pico 1 en el cual no hubo modulación negativa en presencia de TPA y, de la misma manera que en alfa, se reveló la cinasa como un doblete.

PKC delta PM: 78 KDa.

Esta cinasa presentó modulación negativa en el pico 1 al incubarse con TPA, pero en el pico 2 no se registró dicho fenómeno, y como en las anteriores isoformas, se obtuvieron dos especies de diferente peso molecular.

PKC épsilon PM: 90 KDa.

En este caso la isoenzima se detectó solamente en el pico 1 como una sola banda sin que se mostrara modulación negativa con TPA.

PKC theta PM: 79 KDa.

La enzima presenta modulación negativa en el pico 1 al tratarse con TPA. En el pico 2 no hubo "down-regulation", y a semejanza de épsilon, no se encontraron bandas de peso molecular mayor a los 79 KDa.

PKC zeta PM: 72 KDa.

La cinasa se pudo detectar en los picos 1 y 2 aunque con diferente peso molecular aparente en cada pico. En ninguno presentó modulación negativa en el lote con TPA.

PKC mu PM: 115 KDa.

En el caso de mu, su presencia fue detectada en los picos 1 y 2 sin que se manifestara la modulación negativa por efecto del TPA. Se pudieron encontrar bandas de menor peso molecular a los 115 KDa los cuales posiblemente sean productos de degradación.

En resumen, en estos experimentos con hepatocitos de rata se pudo observar la coexpresión de siete isoenzimas de la familia de las PKCs. La purificación parcial de éstas 7 isoformas, utilizando la cromatografía en DEAE-celulosa, y el análisis de las eluidos mediante inmunotransferencia, nos señala que las PKC α , δ , θ , μ y ζ se encuentran en dos formas moleculares diferentes, mientras que PKC β y ϵ se hallaron como un solo tipo molecular (figura 7A). Estos tipos moleculares fueron separados como pico 1 (eluido con un amortiguador adicionado con NaCl 0.08 M) y como pico 2 (eluido con un amortiguador con NaCl 0.25 M), siendo las isoformas de baja fuerza iónica del pico 1 sensibles a la acción del TPA, mientras que con las isoformas de alta fuerza iónica del pico 2, el tratamiento con TPA no indujo los efectos de la modulación negativa. Bajo estos términos, las isoenzimas PKC α , δ , θ , μ y ζ se detectaron en los picos 1 y 2, en tanto PKC β y ϵ sólo estuvieron en el pico 1. También se observó que PKC alfa, beta, delta, zeta y mu aparecieron como 2 o más bandas con diferente movilidad electroforética en los picos 1 ó 2, mientras que PKC épsilon y theta sólo se visualizaron como una sola banda bien definida en los picos 1 ó 2 (figura 7A).

Translocación de las isoformas de PKC expresadas en hepatocitos causada por sus activadores.

Existen una gran cantidad de trabajos, realizados en diversas líneas celulares, en donde se ha reportado que, tanto los ésteres de forbol como los activadores fisiológicos de la PKC, causan la redistribución de la enzima desde el citosol hacia los compartimentos membranales con la subsecuente activación de la cinasa. Basados en estudios de "Western blot", particularmente con la isoenzima alfa, se sabe que la translocación inducida por TPA produce una caída de la señal de la PKC en el citoplasma y un aumento concomitante de la misma en la membrana plasmática (101, 102). Para investigar la manera en que los activadores de la PKC influyen en la redistribución de las 7 isoenzimas expresadas en hepatocitos de rata, se realizaron una serie de experimentos en los cuales, partiendo de las citadas células, aisladas en fresco por la técnica de Berry y Friend (98), se les incubó a 37 °C durante 5 minutos en ausencia o en presencia de los activadores (TPA 1 μ M y epinefrina 10 μ M + 10 μ M de propranolol). A continuación los hepatocitos se lisaron para obtener en primer lugar los componentes citosólicos y posteriormente las partes membranales y nucleares por separado (ver materiales y métodos); a cada fracción subcelular se le cuantificó el contenido de proteínas. Estos extractos se resolvieron por SDS-PAGE al 10%, y por medio de ensayos de "Western blot", se analizó la presencia de las isoformas de PKC en cada una de las fracciones subcelulares mediante anticuerpos isoenzima específicos. Para cada una de las isoformas que se coexpresan en los hepatocitos, se efectuaron estudios de densitometría y de análisis de imagen con el

fin de medir cuantitativamente la presencia de las isoenzimas en los lotes control y en los tratados con los activadores. Los resultados se pueden observar en la figura 8 (paneles A - G) y el resumen de éstos en la tabla I.

TABLA I

ISOENZIMA	TPA				EPINEFRINA					
	Redistribución		Modulación negativa		Redistribución		Modulación negativa			
	FP	N	% pérdida	% detección	FP	N	% pérdida	% detección		
α	✓	✓	---	0	100	---	---	✓	13	87
β	---	✓	✓	48	54	---	---	✓	14	86
δ	---	---	✓	38	62	---	---	✓	40	60
ϵ	✓	✓	---	0	100	---	*	---	0	200
θ	✓	---	✓	89	11	---	---	✓	91	9
μ	---	✓	✓	74	26	---	✓	✓	33	67
ζ	---	✓	---	0	100	---	---	---	0	100

--- ausencia de redistribución

✓ presencia de redistribución

FP: Fracción particulada. N: núcleo.

* Mayor detección de la proteína con respecto al control.

Como puede observarse, la mayoría de las isoformas de PKC, excepto delta, sufren redistribución al incubar a las células con TPA 5 minutos, siendo más frecuente al núcleo. Epinefrina en cambio, no provoca translocación de ninguna de ellas, excepto de la PKC mu, que se transloca al núcleo. También se puede observar claramente que ambos agentes utilizados para activar a PKC provocan una modulación negativa aparente en diferentes grados (indicados en la tabla I) de las isoenzimas α , β , δ , θ y μ , pero ninguno de aquellos provoca una modulación negativa de PKC ϵ y ζ . Es importante hacer notar que la modulación negativa obtenida en estos experimentos puede ser aparente y no real, debido a que solamente indica la incapacidad del anticuerpo isoenzima-específico para detectar determinada forma molecular de la enzima (fosforilada o no) por lo que se evaluó también verificando el estado de activación de cada isoenzima en los siguientes experimentos.

Ensayos de actividad enzimática de PKC

Se ha reportado en diversas líneas celulares, incluyendo a hepatocitos de rata, que el TPA ejerce otro efecto sobre la PKC, en el cual el tratamiento con el éster de forbol abate parcial o totalmente la actividad catalítica de la enzima sobre varios de sus sustratos como la histona HI, la vinculina, la

protamina y otros (75, 76). Este descenso en la actividad enzimática se ha ligado estrechamente a la desfosforilación de la enzima en residuos claves quienes mantienen a la PKC en un estado catalíticamente competente. Diversos trabajos han señalado que la desfosforilación es un evento previo a la inactivación de la enzima. Respecto a lo anterior Bornancin et al. han reportado que la fosforilación del residuo de treonina 638 de PKC α está implicada en la tasa de desfosforilación e inactivación de la enzima, puesto que la pérdida del fosfato en el residuo de treonina 638 hace susceptible a la PKC a la acción de fosfatasa, proteasas y agentes oxidantes quienes promueven una caída significativa en la actividad catalítica (86). Con base en lo observado en los estudios de translocación de las distintas isoenzimas de la PKC, al tratarse a los hepatocitos de rata con sus activadores, se procedió a investigar el efecto que tienen el TPA y la epinefrina sobre la actividad enzimática de la PKC. Con este fin se tomaron en cuenta a las isoformas de PKC de hepatocitos de rata que manifestaron de manera más evidente el fenómeno de modulación negativa por efecto de la epinefrina y el TPA. Así entonces, se seleccionaron a las isoenzimas alfa, delta, theta y zeta para determinar si el tratamiento con dichos activadores durante 5 minutos afecta su actividad enzimática y verificar su relación con la modulación negativa. Hay reportes que señalan a PKC zeta como un isotipo que no es activado por TPA en varias líneas celulares (82) y aunque PKC zeta no presenta modulación negativa, no se conoce el efecto de los dos activadores sobre su actividad catalítica. También se consideró en la selección el hecho de examinar al menos a una isoenzima de cada familia (α , convencional; δ y θ nuevas y ζ , atípicas.)

Los hepatocitos recién aislados se incubaron con TPA 1 μ M por 5 minutos a 37 °C. Las células se lisaron en frío con el amortiguador de homogenización adicionado con Tritón X-100, en presencia y en ausencia de inhibidores de fosfatasa. La aplicación de estos inhibidores se efectuó con el objeto de averiguar si el estado de fosforilación de las PKCs tiene alguna relevancia en la pérdida de su capacidad catalítica, puesto que se ha reportado que la estabilidad y actividad de la PKC es regulada por eventos que mantienen a la enzima fosforilada en su dominio catalítico (86). Los extractos celulares solubles en Tritón X-100 se inmunoprecipitaron con anticuerpos antiPKC isoenzima específicos y con dichos inmunoprecipitados se realizaron los ensayos de actividad enzimática de PKC in vitro como se describe en los métodos experimentales. Los resultados que se muestran a continuación reflejan el comportamiento catalítico de los isotipos de PKC sobre el sustrato histona, al cual se le incorporan fosfatos marcados radiactivamente. Incluso se puede observar el fenómeno de autofosforilación de la PKC, el cual se detectó en la autorradiografía como una banda ubicada entre los 100 y 80 Kda, como se puede apreciar en las figuras 10 y 12.

Como se observa en la figura 9, PKC alfa, delta, theta y zeta presentaron una pérdida considerable de su actividad enzimática, al tratarse con TPA en ausencia de inhibidores de fosfatasa. La disminución de su actividad fue del orden del 60% para alfa, 79% para delta, 84% para theta y 76% para zeta. Con el objeto de probar que la pérdida de actividad enzimática en estas isoformas de PKC puede estar relacionada con la acción de fosfatasa, cuya acción es importante durante los 5 minutos de

incubación *in vivo* con el TPA y/o durante el proceso de lisis seguida por la inmunoprecipitación de la PKC, se hicieron los mismos ensayos de actividad, con la salvedad de que las células se lisaron y procesaron en presencia de un coctel de inhibidores de fosfatasas mencionado en la metodología. Los resultados cualitativos y cuantitativos que se muestran en la figura 10, indican que la aplicación de los inhibidores impide la pérdida de la actividad enzimática en las isoformas PKC delta y zeta, activadas con TPA, respecto a los lotes incubados sin inhibidores (figura 9), y en contraparte, las PKC alfa y PKC theta tratadas con el éster de forbol, exhiben solamente una recuperación modesta de su actividad catalítica puesto que PKC alfa siguió perdiendo 53% de su actividad y theta del 66% con respecto a los controles. Lo anterior nos señala que la presencia de inhibidores de fosfatasas no es una condición que permita, por sí misma, la recuperación de la actividad enzimática de dos de las cuatro isoformas de PKC estudiadas.

Paralelamente, se realizaron experimentos para averiguar cómo es afectada la actividad catalítica de las isoformas de las PKCs estudiadas en respuesta a un activador fisiológico como la epinefrina. Para este fin, se utilizó 10 μM de dicha hormona acompañada con propranolol 10 μM durante 5 minutos a 37 °C. De la misma manera se realizaron los experimentos de actividad enzimática de la PKC y las cuantificaciones de la fosforilación específica con las 4 isoformas de PKC.

Los resultados de la figura 11, en donde no se añadieron los inhibidores de fosfatasas, muestran efectos diferentes de la epinefrina comparados con los obtenidos con el TPA. En estos ensayos, ninguna de las cuatro isoformas incubadas con la hormona manifiesta pérdida alguna de actividad. Interesantemente, al parecer en estas condiciones los efectos promovidos por cada activador son diferenciales, pues se observa que mientras con TPA las PKC tienden a experimentar las fases iniciales de la modulación negativa (descenso de la actividad catalítica), con epinefrina, por el contrario, no hay una caída de actividad e incluso se presenta un incremento de la misma, especialmente en delta, fenómeno también conocido como "up-regulation" o modulación positiva. En los experimentos donde se añadieron los inhibidores (representadas en la figura 12) las cuatro isoformas de PKC tratadas con epinefrina no exhibieron la pérdida de actividad enzimática, pero tampoco mostraron un incremento como en el ensayo anterior. Estos resultados se resumen en la tabla II.

Tabla II

Actividad de PKC α , δ , θ y ζ en ausencia y presencia de inhibidores de fosfatasa.

ISOENZIMA	TPA		EPINEFRINA	
	Actividad		Actividad	
	- inhibidores	+ inhibidores	- inhibidores	+ inhibidores
α	40 % \pm 8	49 % \pm 9	128 % \pm 20	114 % \pm 10
δ	22 % \pm 4	100 % \pm 15	175 % \pm 25	110% \pm 10
θ	15 % \pm 5	43 % \pm 10	120 % \pm 21	97 % \pm 9
ζ	25 % \pm 10	110 % \pm 9	148 % \pm 20	109 % \pm 12

Tabla III

Modulación negativa de los 7 tipos de PKC integrando los fenómenos de redistribución y de actividad de la enzima inducidos por sus activadores

ISOENZIMA	TPA			EPINEFRINA						
	MODULACION NEGATIVA			MODULACION NEGATIVA						
	Redistribución		Actividad		Redistribución		Actividad			
	FP	N	% det.	- inh.	+ inh.	FP	N	% det.	- inh.	+ inh.
α	✓	✓	100	40 %	49 %	---	---	87	128 %	114 %
β	---	✓	52	N.D.	N.D.	---	---	86	N.D.	N.D.
δ	---	---	62	22 %	100 %	---	---	60	175 %	110 %
ϵ	✓	✓	100	N. D.	N.D.	✓	---	200	N.D.	N.D.
θ	✓	---	11	15 %	43 %	---	---	9	120%	97 %
μ	---	✓	26	N.D.	N.D.	---	✓	67	N.D.	N.D.
ζ	---	✓	100	25 %	110 %	---	---	100	148 %	109 %

% det: porcentaje de detección inmunológica

\pm inh: presencia y ausencia de inhibidores de fosfatasa

Efecto del TPA y la epinefrina en el estado de fosforilación de la PKC alfa

Debido a que existen anticuerpos comerciales sitio-específicos contra PKC alfa, capaces de reconocer de manera específica la forma fosforilada del residuo de serina 657, localizado en su extremo carboxilo e implicado en la regulación de la actividad de PKC alfa, se procedió a analizar el efecto que ejercen el TPA y la epinefrina en el estado de fosforilación de esta isoforma utilizando a este anticuerpo. Se realizaron experimentos en donde los hepatocitos de rata recién aislados, se incubaron con o sin TPA (1 μM) o con y sin epinefrina 10 μM + propranolol 10 μM por 5 minutos a 37 °C. Las células se lisaron en un amortiguador de homogenización con Tritón X-100 adicionado con un coctel de inhibidores de fosfatasa. Los lisados solubles en detergente se pretrataron con suero pre-inmune y más tarde se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-PKC alfa que reconoce a PKC α en general estando fosforilada o no. Los inmunoprecipitados obtenidos se resolvieron en SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a nitrocelulosa para su análisis en "Western blot" utilizando anticuerpos dirigidos contra el extremo carboxilo terminal de alfa, así como un anticuerpo que reconoce específicamente el residuo serina 657 en su condición fosforilada. Los filtros de nitrocelulosa se incubaron con segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa de rábano y las bandas se revelaron mediante quimioluminiscencia para finalmente analizar las imágenes por densitometría.

Los resultados mostrados en la figura 13 indican que la PKC alfa inmunoprecipitada de células tratadas con TPA y reconocida por un anticuerpo dirigido contra su dominio catalítico, (que detecta las especies fosforiladas o desfosforiladas de la proteína) no presenta una pérdida en la detección de la enzima comparando con el control. Lo anterior contrasta con el uso del anticuerpo dirigido específicamente contra el residuo de serina 657 fosforilada. Se aprecia claramente que la señal de alfa tratada con TPA disminuye en un 50% con respecto al control, indicando que el éster de forbol promueve la desfosforilación de la enzima, al menos en el residuo 657. Por su parte la acción de la epinefrina, no produce lo mismo que lo visto con el éster de forbol. Se observa que comparado con células control, la señal no disminuye y por el contrario aumenta en un 20%, indicando que la epinefrina promueve la hiperfosforilación del residuo de Ser 657 en PKC alfa. Estos resultados señalan claramente que los efectos sobre el estado de fosforilación de PKC alfa difieren según la naturaleza del activador implicado y que la modulación de la actividad de PKC α se logra en parte, por la inducción de un cambio en el estado de fosforilación de su extremo carboxilo.

EXPRESION DE ISOFORMAS DE PKC EN HEPATOCITOS DE RATA

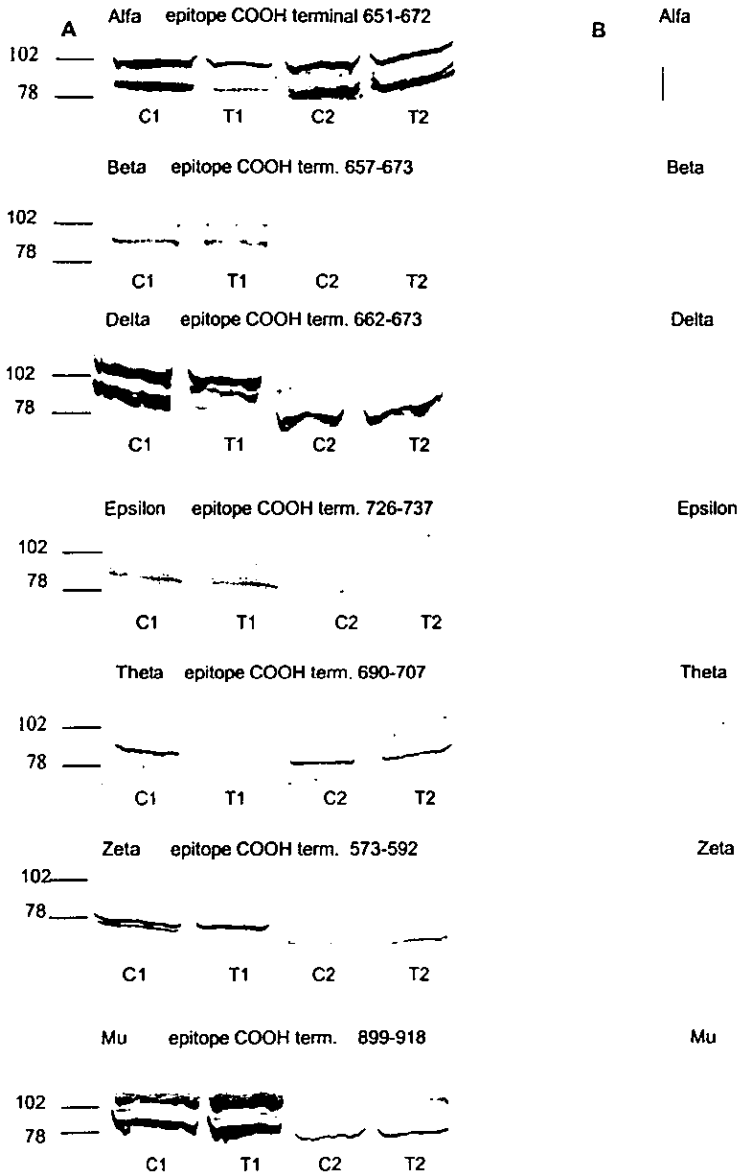


FIGURA 7. Expresión de isoformas de PKC en hepatocitos de rata. A. Las células aisladas en fresco se incubaron con TPA $1\mu\text{M}$ por 5 minutos a 37°C . Se homogenizaron las células y los extractos solubles en detergente se cargaron a columnas de DEAE-celulosa para obtener las PKC semipurificadas en el pico 1 (eluido con 0.08 M de NaCl) y el pico 2 (eluido con 0.25 M de NaCl). Se tomaron $100\ \mu\text{g}$ de proteína para ensayos de inmunotransferencia revelándose con la reacción colorida de BCIP-NBT. Se mencionan los epitopes reconocidos por los anticuerpos anti-PKC. B. Las células se procesaron como se describe en A, pero el análisis de "Western blot" se hizo en presencia del péptido antígeno de cada anticuerpo para probar la especificidad del mismo. C1: control pico 1; T1: TPA pico 1; C2: control pico 2; T2: TPA pico 2.

REDISTRIBUCION DE LAS ISOFORMAS DE PKC POR EFECTOS DE SUS ACTIVADORES

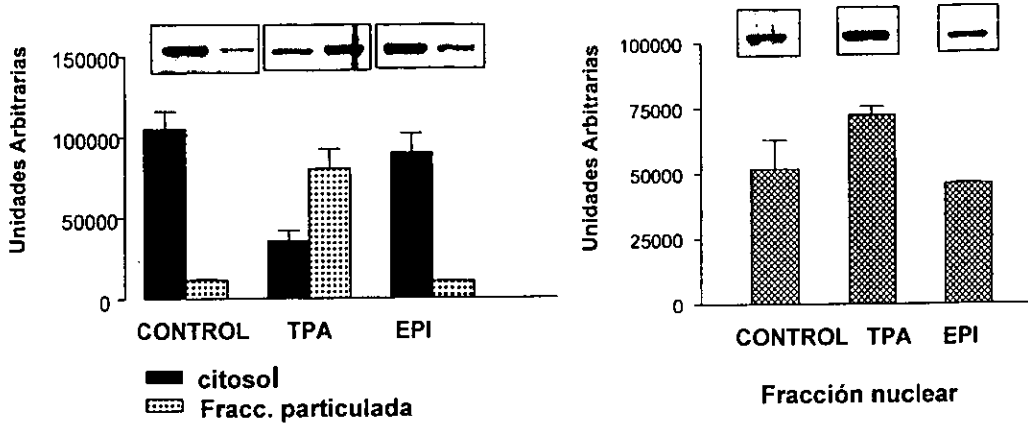
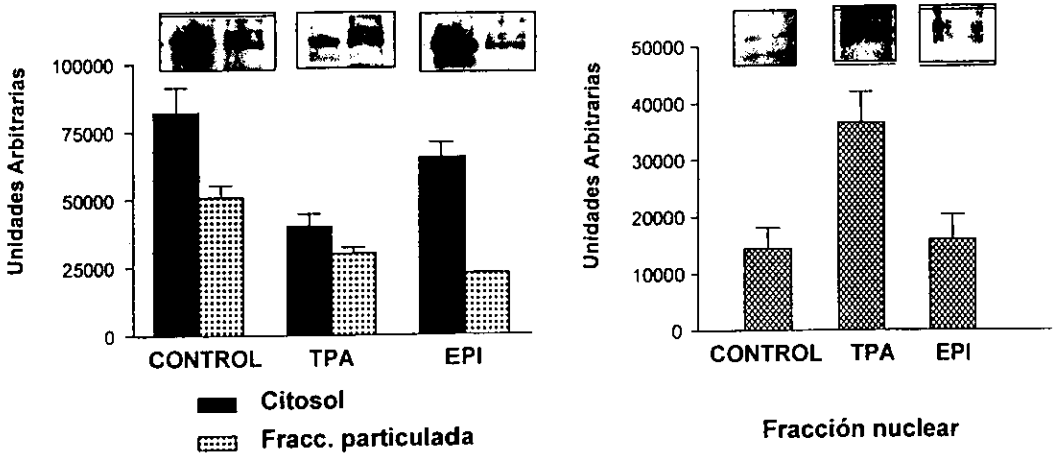
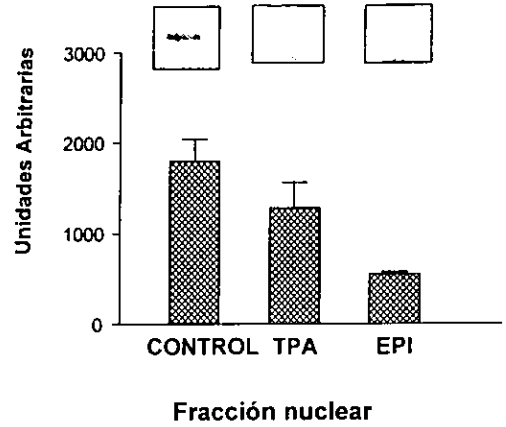
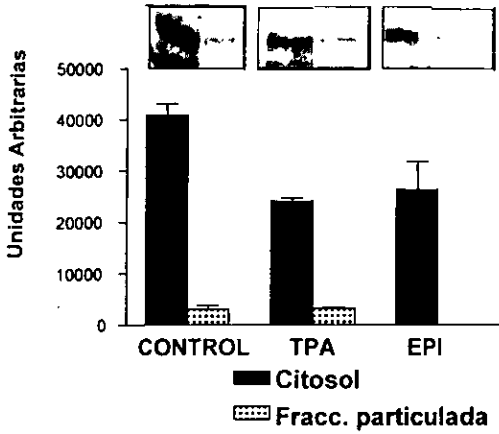
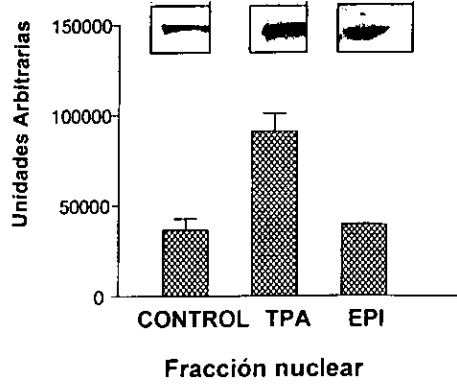
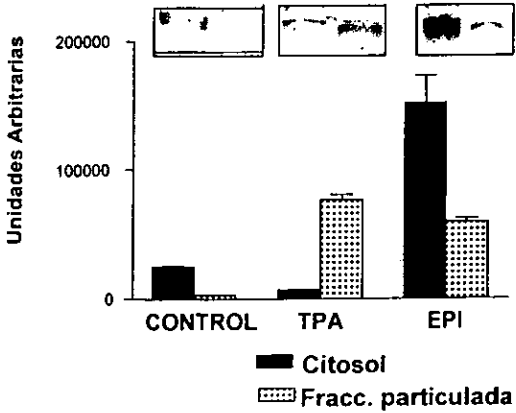
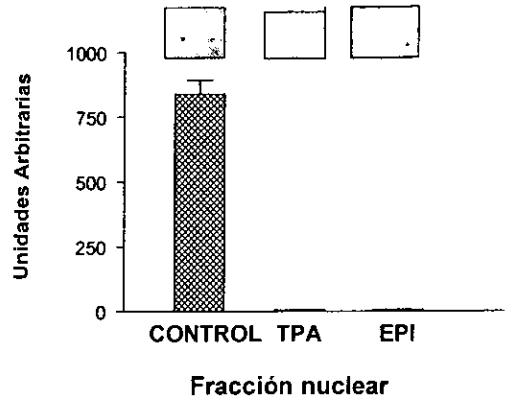
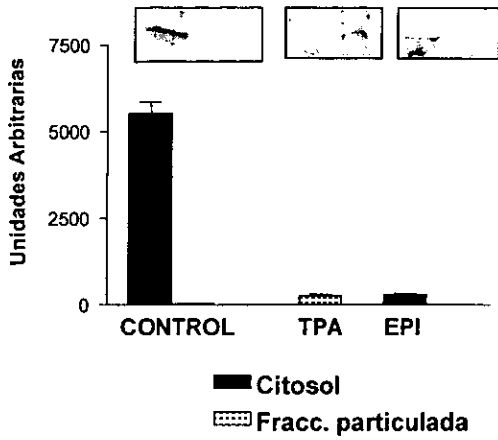
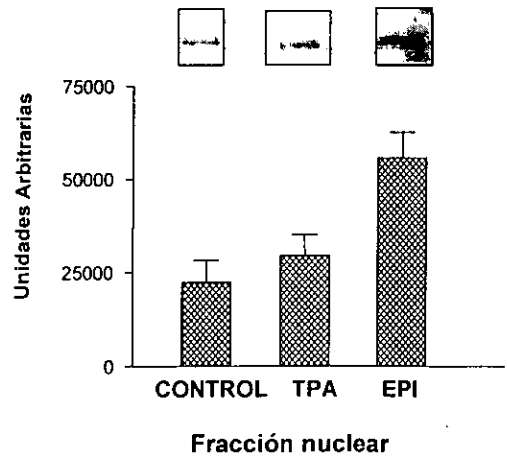
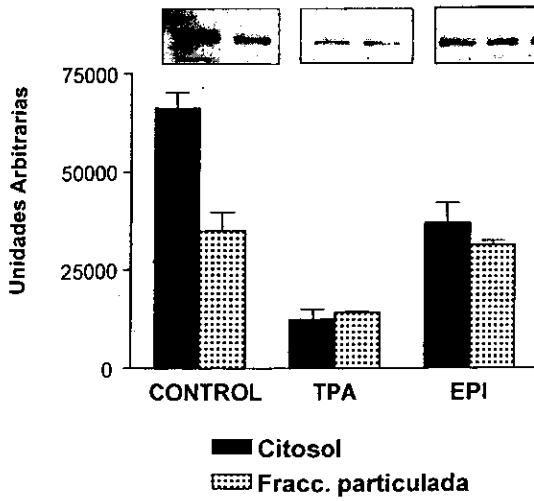
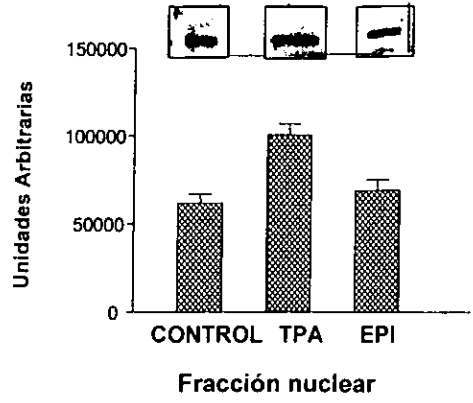
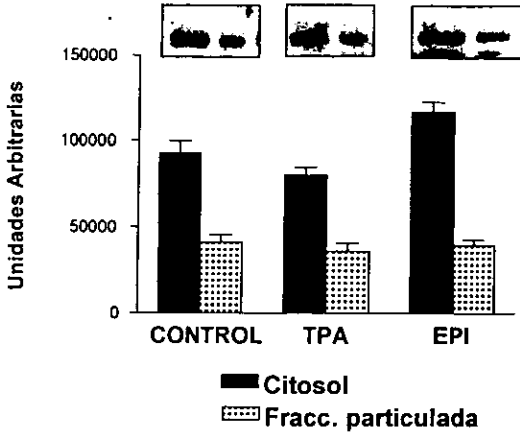
8 A PKC α 8 B PKC β 

Figura 8. Redistribución de las isoformas de PKC por efectos de sus activadores. Los hepatocitos se trataron con TPA 1 μ M y con epinefrina 10 μ M más propranolol 10 μ M por 5 minutos a 37 $^{\circ}$ C. La células se lisaron en ausencia o presencia de Tritón X-100 al 1 % para obtener las fracciones citosólicas y membranales respectivamente. Simultáneamente se obtuvieron los núcleos de las células tratadas o no con los activadores de PKC como se describe en Materiales y Métodos. Se tomaron 100 μ g de proteína por cada fracción celular y se procesaron para "Western blot". Las membranas se incubaron con anticuerpos anti-PKC específicos y se revelaron con segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina mediante quimioluminiscencia. Se realizó la densitometría en las autorradiografías. Se muestran los promedios \pm el error estándar de la media de 3 a 4 preparaciones celulares independientes. $p=0.03$ (alfa), $p=0.02$ (beta), $p=0.04$ (delta), $p=0.01$ (mu), $p=0.03$ (theta), $p=0.02$ (zeta), $p=0.001$ (epsilon). Se presentan las 7 isoformas coexpresadas en hepatocitos de rata. CIT: citosol; FP: fracción particulada. CTL: control. Epi + Prop: epinefrina + propranolol.

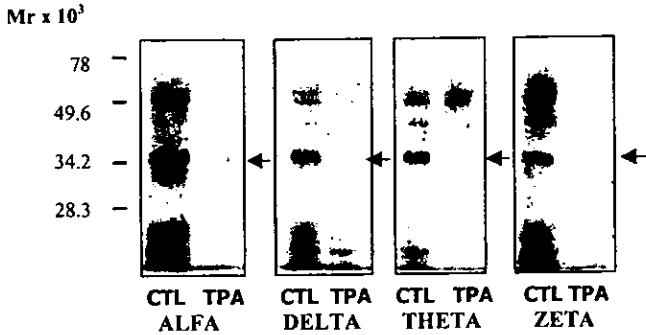
8 C PKC δ 8 D PKC ϵ 

8 E PKC θ 8 F PKC μ 

8 G PKC ζ 

A

Actividad enzimática de PKC inducida por TPA en ausencia de inhibidores de fosfatasa



B

FOSFORILACION ESPECIFICA

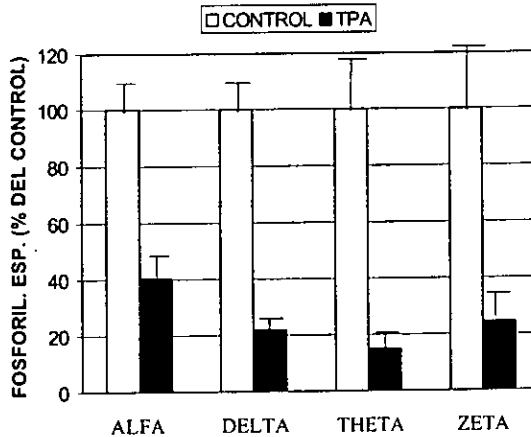
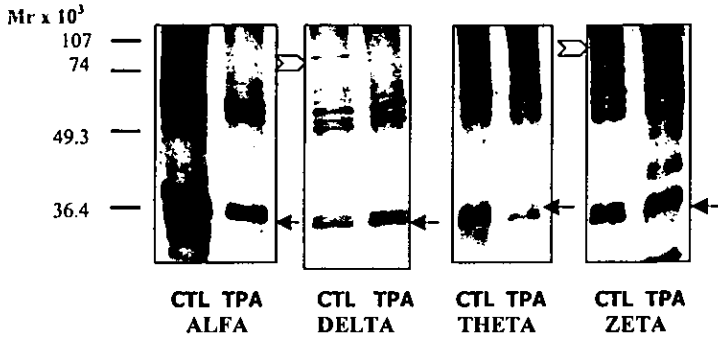


Figura 9. Actividad enzimática de PKC α , δ , θ y ζ inducida por TPA sin inhibidores de fosfatasa. Los hepatocitos, recién aislados fueron incubados *in vivo* en ausencia (control) o en presencia de TPA 1 μ M durante 5 minutos, después de lo cual se lisaron en solución homogenizadora con Tritón X-100. Los lisados se inmunoprecipitaron con anticuerpos específicos contra PKC α , δ , θ y ζ . Los inmunoprecipitados de cada isoforma se sometieron a ensayos de actividad *in vitro* usando como sustrato a la histona como se describió en la metodología. Una vez terminada la reacción, las muestras se separaron en SDS-PAGE al 12%, se tiñieron con azul de Coomassie y el gel secado se expuso para autorradiografía. El panel A muestra la imagen de un experimento representativo, en donde se indican los pesos moleculares relativos y las flechas señalan la posición de la histona H1. En B se muestran los resultados promedio \pm el error estándar de la fosforilación específica normalizada en porcentaje respecto al control, calculado de tres experimentos independientes ($p < 0.05$). La fosforilación específica se define como el cociente de las unidades arbitrarias obtenidas del análisis de densitometría de la proteína fosforilada (autorradiografía) entre el total de las unidades del análisis de densitometría del gel teñido y expuesto (proteína).

A

Actividad enzimática de PKC inducida por TPA en presencia de inhibidores de fosfatasa



B

FOSFORILACION ESPECIFICA

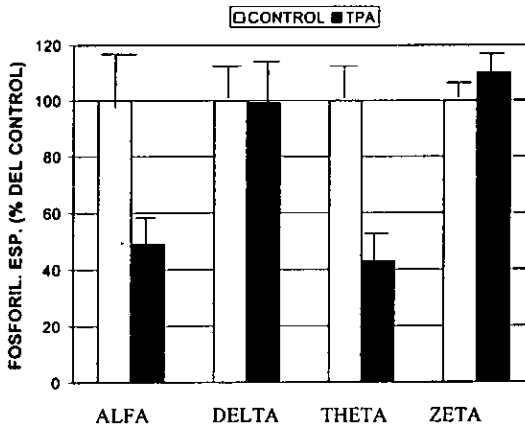
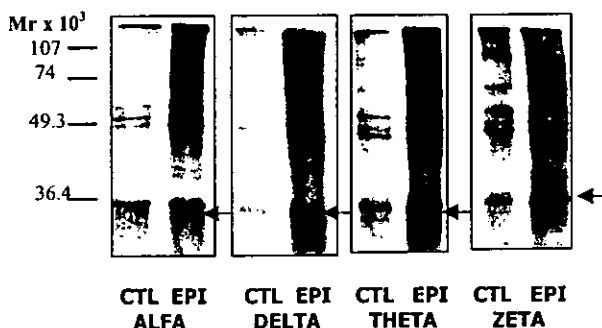


Figura 10. Actividad enzimática de PKC α , δ , θ y ζ inducida por TPA en presencia de inhibidores de fosfatasa. Los hepatocitos, tratados *in vivo* con TPA 1 μ M y los control, se lisaron en solución homogenizadora con tritón X-100. Los lisados se inmunoprecipitaron con anticuerpos específicos contra PKC α , δ , θ y ζ . Estos inmunoprecipitados de cada isoforma se sometieron a ensayos de actividad *in vitro* usando a la histona H1 como sustrato (ver metodología). Terminada la reacción, las muestras se corrieron en SDS-PAGE al 12%, el gel se tiñó con azul de Coomassie y ya secado se expuso para autorradiografía (ver panel A) en donde se indican los pesos moleculares relativos; las flechas señalan la posición de la histona y las puntas de flecha a la PKC autofosforilada en la imagen de un experimento representativo. En B se muestran los resultados de la fosforilación específica definida como el cociente de las unidades obtenidas del análisis de densitometría de la proteína fosforilada (autorradiografía) entre el total de las unidades del análisis de densitometría de la proteína (gel teñido). Los valores de las barras representan el promedio \pm el error estándar de las densitometrías normalizadas en porcentajes con respecto a los controles de 3 experimentos independientes ($p < 0.05$).

A

Actividad enzimática de PKC α , δ , θ y ζ inducida por epinefrina sin inhibidores de fosfatasa.



B

Fosforilación específica

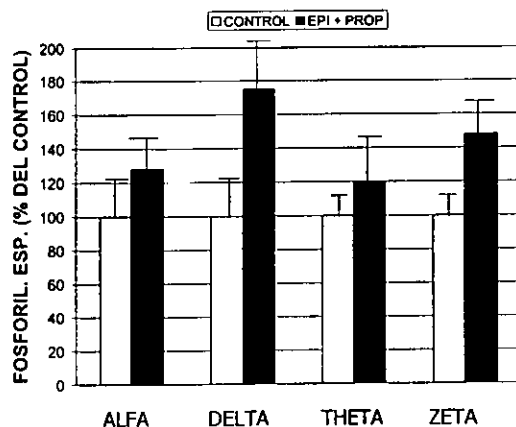
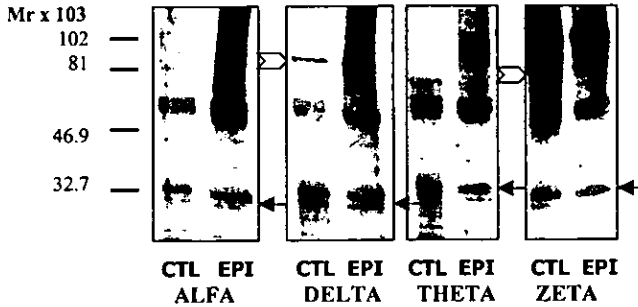


Figura 11. Actividad enzimática de PKC α , δ , θ y ζ inducida por epinefrina sin inhibidores de fosfatasa. Los hepatocitos, recién aislados fueron incubados *in vivo* con Epinefrina $10 \mu\text{M}$ más propanolol $10 \mu\text{M}$ por 5 minutos y el control (en ausencia de la hormona), se lisaron en solución homogenizadora con Tritón X-100. Los lisados se inmunoprecipitaron con anticuerpos específicos contra PKC α , δ , θ y ζ . Los inmunoprecipitados de cada isoforma se sometieron a ensayos de actividad *in vitro* usando como sustrato a la histona H1 de acuerdo a la metodología. Terminada la reacción, las muestras se separaron en SDS-PAGE al 12%, se tiñeron con azul de Coomassie y el gel secado se expuso para autorradiografía (panel A), en donde se muestra la imagen representativa de un experimento, se indican los pesos moleculares relativos y las flechas señalan la posición de la histona. En B se muestran los resultados de la fosforilación específica definida como el cociente de la proteína fosforilada (autorradiografía) entre el total de la proteína (gel teñido). Los valores de las barras son el promedio \pm el error estándar de las densitometrías normalizadas en porcentajes con respecto a los controles de 3 experimentos independientes ($p < 0.05$).

A

Actividad enzimática de PKC α , δ , θ y ζ inducida por epinefrina en presencia de inhibidores de fosfatasa.



B

FOSFORILACION ESPECIFICA

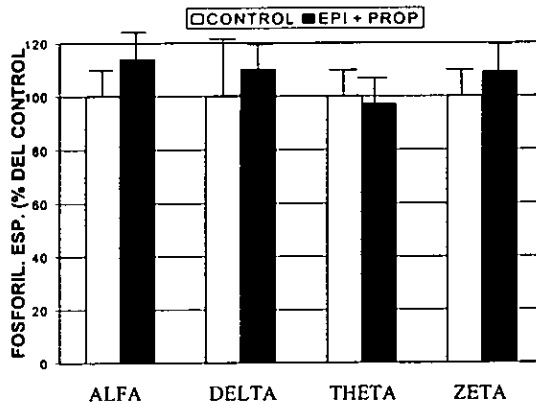


Figura 12. Actividad enzimática de PKC α , δ , θ y ζ inducida por epinefrina con inhibidores de fosfatasa. Los hepatocitos, tratados *in vivo* con epinefrina 10 μ M más propanolol 10 μ M y los control, se lisaron en solución homogenizadora con Triton X-100. Los lisados se inmunoprecipitaron con anticuerpos específicos contra PKC α , δ , θ y ζ . Estos inmunoprecipitados de cada isoforma se sometieron a ensayos de actividad *in vitro* usando como sustrato a la histona (ver metodología). Una vez terminada la reacción, las muestras se corrieron en SDS-PAGE al 12%, se tiñeron con azul de Coomassie y el gel seco se expuso para autorradiografía (panel A) en donde se indican los pesos moleculares relativos, las flechas señalan la posición de la histona H1 y las puntas de flecha a la PKC autofosforilada en la imagen de un experimento representativo. En B se muestran los resultados de la fosforilación específica definida como el cociente de las unidades obtenidas del análisis de densitometría de la proteína fosforilada (autorradiografía) entre el total de las unidades del análisis de densitometría de la proteína (gel teñido). Los valores de las barras son el promedio \pm el error estándar de las densitometrías normalizadas en porcentajes con respecto a los controles de 3 experimentos independientes ($p < 0.05$).

DETECCION DE PKC ALFA CON UN ANTICUERPO SITIO-ESPECIFICO OBTENIDO DE HEPATOCITOS TRATADOS EN PRESENCIA O AUSENCIA DE TPA Y EPINEFRINA

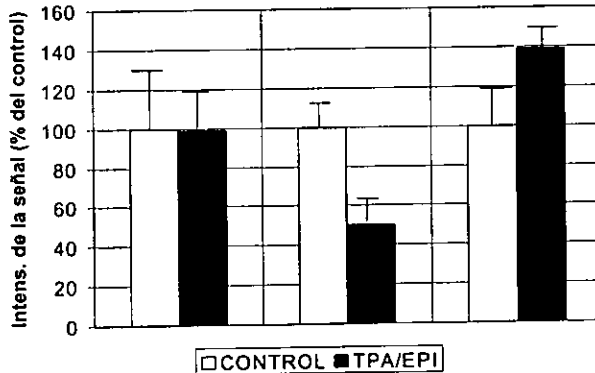
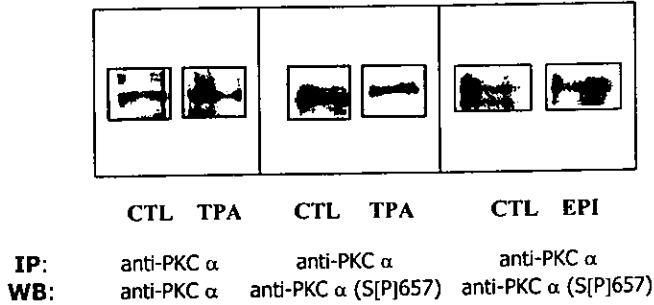


FIGURA 13. DETECCION DE PKC ALFA FOSFORILADA CON UN ANTICUERPO SITIO-ESPECIFICO Y EL EFECTO INDUCIDO POR EL TPA Y LA EPINEFRINA. Los hepatocitos fueron tratados con o sin activadores (TPA 1 μ M y epinefrina 10 μ M) por 5 minutos. Los lisados celulares solubles en tritón X-100 se procesaron para inmunoprecipitar a la PKC α con un anticuerpo dirigido al extremo carboxilo. Los inmunoprecipitados se analizaron por "Western blot". Las membranas se incubaron por separado con 2 anticuerpos anti-PKC α : el panel izquierdo muestra el resultado de la incubación con un anticuerpo dirigido a la región catalítica de la PKC en condiciones no fosforiladas; en el intermedio se reconoce específicamente a la serina 657 fosforilada del carboxilo terminal de hepatocitos incubados con TPA; en el panel derecho se utilizó el mismo anticuerpo ya mencionado en hepatocitos incubados con epinefrina. Los blots se revelaron por quimioluminiscencia. En la parte superior se muestra la imagen de un experimento representativo y en la gráfica se muestran los resultados promedio \pm el error estándar del análisis de densitometría expresados en porcentaje con respecto al control de tres experimentos realizados con diferentes preparaciones celulares ($p < 0.05$).

DISCUSION

Expresión de isoenzimas de PKC en hepatocitos de rata

En el pasado se demostró que la exposición crónica de células a los ésteres de forbol conducen a la pérdida de la detección inmunológica de la PKC, fenómeno que se designó como "down-regulation". El tiempo de exposición requerido variaba dependiendo del tipo celular, pudiéndose presentar a las 18 horas en el caso de células de glioma de rata (70) o en cuestión de 1 a 3 días en células epidérmicas JB6 (71). Se confirmó que esta caída en la señal, inducida por TPA, se debe principalmente a un incremento en la tasa de degradación de la enzima (70). Sin embargo, existen también reportes de que la "down-regulation" de diferentes formas de PKC puede ocurrir a tiempos de activación muy cortos (74, 75). Nuestros resultados concuerdan con estos reportes en cuanto a que varias especies de PKC coexpresadas en un mismo tipo celular desaparecen a diferente velocidad por tratamiento con TPA, y también en cuanto a que la pérdida de actividad inducida por el éster de forbol puede ser muy rápida (1 a 5 minutos). No obstante, la base molecular de este fenómeno no se ha aclarado hasta el momento, y constituyó el objeto de estudio de este trabajo.

Identificación de las isoformas de PKC que se expresan en hepatocitos de rata tratados en presencia o ausencia de TPA

Como puede observarse en la figura 7, se encontró que los hepatocitos de rata coexpresan 2 PKC convencionales: alfa y beta; 4 PKC nuevas: delta, epsilon, mu y theta y una atípica: zeta. Otros autores ya habían reportado la expresión de 5 de estas isoenzimas, pero no de PKC theta y de PKC mu, las cuales recientemente se han reportado en el laboratorio (66). En la figura 7 se puede observar también que 4 de las isoformas de PKC encontradas (α , δ , θ y μ) sorprendentemente aparecen en los dos picos de elución obtenidos de la cromatografía en DEAE-celulosa, lo que indica que existen en el hepatocito al menos en dos formas moleculares distintas. Además también algunas de ellas se observan en un mismo pico de elución como un doblete en el análisis de Western blot.

Se ha demostrado que la fosforilación de la PKC produce que la enzima tenga una movilidad relativa menor con respecto a la no fosforilada al separarse mediante electroforesis, debido al incremento en su carga negativa, reflejándose en un mayor peso molecular relativo (113). Este fenómeno de retardamiento puede explicar la aparición de dos bandas en las inmunotransferencias presentadas en la figura 7A correspondientes a las PKC alfa, beta, delta y zeta, en donde una de las bandas se ubica en el peso estándar de las PKC y la otra, encontrada en una posición de mayor peso molecular, puede representar a las isoenzimas hiperfosforiladas, especialmente en el caso de delta quien es susceptible de fosforilarse en residuos de tirosina (40). Una explicación alternativa es que también puede intervenir otro tipo de modificación postraducciona denominada ubiquitinación, en donde se sabe que las PKC

ubiquitinadas son reconocidas por el proteosoma, e incluso se ha reportado que las PKC alfa y épsilon activadas por TPA se enlazan a la ubiquitina como un paso previo a su degradación proteolítica (97). En las PKC épsilon y theta, presentadas en las inmunotransferencias de la figura 7A, se localizó una sola banda ubicada en el peso molecular normal de estas isoenzimas. La ausencia de bandas de mayor peso molecular sugiere que la presencia de PKC épsilon y theta, ya sea en su forma hiperfosforilada o ubiquitinada, no se detectó bajo las condiciones ensayadas y quizás se deba a las características particulares de estas isoenzimas. La presencia de varias bandas en PKC mu se debe probablemente a la presencia de la enzima en su forma convencional, cuyo peso molecular es de 115 KDa y las bandas de menor peso sean productos de degradación de la proteína, ya que generalmente en la purificación parcial de las PKC, además de obtener a la enzima completa, también se detectan fragmentos correspondientes a péptidos de menor tamaño.

Con respecto a la presencia de la misma isoenzima de PKC en dos picos de elución, de acuerdo a la figura 7A, las isoenzimas de PKC eluidas en el pico 1 con baja fuerza iónica, (0.08M de NaCl) representarían a especies moleculares con una densidad de carga negativa relativamente menor a las PKC eluidas en el pico 2 a una fuerza iónica más grande (0.25 M de NaCl), sugiriendo que estas dos especies eluidas corresponderían a dos tipos distintos de PKC.

De acuerdo al párrafo anterior, era de esperarse que las PKC eluidas en el pico 2 al tener una mayor carga negativa que las PKC eluidas en el pico 1 exhibieran un cambio en su movilidad relativa dando un peso molecular relativamente mayor. Sin embargo, en ningún pico de elución hubo un cambio significativo en sus movilidades relativas al analizarse los inmunoblots respectivos (Figura 7A). Se observó también que estos dos tipos moleculares de la misma isoforma responden de manera diferente a la activación con TPA, pues curiosamente las isoenzimas eluidas en el pico 2, obtenidas de células tratadas con TPA (T2), no exhibieron indicios de modulación negativa, en contraste con las PKCs eluidas en el pico 1 correspondiente a células incubadas con TPA (T1) (Figura 7A). Esto es particularmente evidente en las isoformas alfa, delta y theta, en donde hay una pérdida de la señal que puede interpretarse como una modulación negativa inducida por TPA durante tiempos cortos de incubación (5 minutos) lo cual apoya las evidencias reportadas por Cochet (75) y Ase (74) en el sentido de que la modulación negativa no requiere largos periodos de tiempo para manifestarse.

Todas estas observaciones en el comportamiento de las PKCs puede explicarse de manera tentativa si se considera la intervención de proteínas llamadas de "anclaje". Se sabe que estas moléculas interactúan de manera específica con las PKCs contribuyendo a determinar la localización, activación y función de las PKC en la célula. Recientemente se han mostrado varias evidencias que confirman la interacción específica entre las PKCs y estas proteínas de anclaje o adaptadoras (7). Estas moléculas pueden unirse a las diferentes isoenzimas de PKC, ya sea en estado activo o inactivo, como en el caso de las proteínas RACKs y RICKs (receptores de cinasa C activa e inactiva respectivamente), o en su carácter de sustrato de la enzima tales como la talina, vinculina, MARCKS, SBRC (66). Otras proteínas adaptadoras

que forman complejos multienzimáticos de cinasas y/o fosfatasa son las denominadas AKAPs llamadas así por que originalmente se aislaron como proteínas de anclaje de la proteína cinasa A (PKA de Protein A-Kinase Anchoring) como la AKAP 79 y la gravina/AKAP 250, capaces de asociarse con diferentes isoformas de PKC (100). Considerando la existencia de estas interacciones proteína-proteína, es posible especular que la separación de una misma forma de PKC en dos picos de elución en la cromatografía en DEAE-celulosa probablemente sea una consecuencia de la asociación de las isoenzimas de PKC con dichas proteínas de anclaje, es decir, las PKC del pico 2 se asociarían a proteínas más ácidas, originando un complejo, que para ser eluido, requirió de la aplicación de una fuerza iónica más grande (NaCl 0.25 M), en comparación a las PKC del pico 1 quienes se asociarían a proteínas más básicas, formando un complejo que se eluyó con una fuerza iónica baja (NaCl 0.08 M). La presencia de estos dos tipos de complejos también podría explicar el hecho de que la separación de las enzimas en los picos 1 y 2 se presente tanto en los lotes control como en los tratados con TPA, sugiriendo en estos casos la posible interacción de las proteínas de anclaje tipo RACKs y RICKs con las PKC en su estado activo e inactivo respectivamente. Así entonces, nuestros resultados sugieren que las PKC alfa, delta, theta, mu y zeta son capaces de unirse con al menos dos tipos de proteínas adaptadoras con densidad de carga negativa diferente, y en tanto, las PKC beta y epsilon al parecer sólo pueden enlazarse con un solo tipo de proteína de anclaje de carga similar, aunque hasta el momento no se conozca la identidad exacta de estas proteínas hipotéticas.

Efecto del TPA y la epinefrina en la translocación y activación de la PKC

Un evento bioquímico que acontece cuando la PKC interacciona con sus activadores es la redistribución intracelular de la enzima, es decir, la PKC activada se traslada desde la fracción citosólica hacia la región particulada de la célula que comprende a las membranas celulares y/o elementos del citoesqueleto así como con proteínas nucleares (101, 102). La translocación de las 7 isoenzimas de PKC expresadas en hepatocitos de rata no muestra un patrón común, pues se observó que dependía de la sustancia utilizada para activarlas. Nuestros resultados muestran evidencias de que la modulación negativa, entendida no solamente como la pérdida en la inmunoreactividad de PKC, sino también de su actividad, se presentó a los cinco minutos de incubación con TPA como se pudo apreciar en las inmunotransferencias de los picos 1 y 2 en la semipurificación de PKC con DEAE-celulosa, en los experimentos de redistribución y en los de medición de la actividad de la enzima. Las gráficas e imágenes de la figura 8 (páneos A-G), así como los datos resumidos en la tabla I, nos muestran claramente que mientras el tratamiento de las células con TPA provoca la redistribución de todas las isoformas de PKC expresadas en ellas, excepto de PKC delta, la epinefrina sólo provoca la redistribución al núcleo de PKC mu. Sin embargo, el tratamiento con cualquiera de estos dos agentes produjo pérdidas en la inmunoreactividad de las mismas isoformas (β , δ , θ y μ) produciendo una modulación negativa. La manera en que fue estimada la modulación negativa, mediante ensayos de Western blot y cuantificada por densitometría, nos proporcionó una idea de la presencia relativa de la PKC en los hepatocitos. Este

criterio de evaluación, sin embargo, no es concluyente pues como se ha mencionado previamente (ver referencia 111) para el caso de PKC mu es necesario el uso de un anticuerpo apropiado para detectar la presencia de la enzima, ya que hay la posibilidad de que pueda observarse una modulación negativa aparente de PKC mu si se utiliza otro tipo de anticuerpo que no la reconoce debido a su cambio en el estado de fosforilación. La redistribución de varias isoformas de PKC inducida por el TPA a la fracciones particuladas y nucleares, acompañada del descenso de la señal de la PKC en el citosol, excepto en zeta, ha sido también reportada en otros trabajos usando diferentes tipos celulares en condiciones similares a las realizadas en el presente trabajo (103). En este estudio se obtuvo una clara respuesta de PKC zeta al tratamiento con TPA, no sólo porque se transloca al núcleo en respuesta a éste, sino porque su actividad se ve afectada negativamente también por TPA, aparentemente por cambios inducidos en su estado de fosforilación (ver tabla III y figuras 8-G y 9). La translocación de zeta contraviene el hecho de que tal isoenzima no responde a la acción del TPA como se ha reportado en la literatura (82). Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que el TPA es capaz de unirse e inducir la translocación de una familia de proteínas llamadas quimerinas, las cuales son semejantes a las PKC atípicas en razón de que poseen un solo dominio C1 en su estructura proteica, con un 40% de homología en esa región con respecto a PKC y además dependen de fosfolípidos para unirse a los ésteres de forbol, aunque no presentan actividad de cinasa (104). Incluso otro tipo de experimentos han evidenciado, mediante ensayos de inmunofluorescencia con ayuda de la proteína verde fluorescente (GFP), que PKC gamma mutada de tal modo que sólo contaba con un solo dominio C1, fue capaz de translocarse a la fracción membranal (105). Es posible que la translocación de PKC zeta inducida por TPA sea semejante a la reportada por la quimerina, aunque hasta la fecha es muy limitado el conocimiento que se tiene sobre la regulación y función de dichas proteínas. En cambio, esta isoforma atípica no mostró pérdida de la señal después de incubarse con TPA lo que coincide con lo hasta ahora reportado en varias líneas celulares en el sentido de que PKC zeta no se modula negativamente por la acción del éster de forbol (82). Por otro lado, La modulación negativa en PKC beta, delta, theta y mu es evidente después de ser incubadas con el TPA (figura 2 b, c, d y e) y al menos con delta y theta, se ha presentado el mismo fenómeno en células PC12 (103) y en células MEL respectivamente (42). La isoenzima delta fue la única que no presentó translocación. En contraste, se ha reportado en células CHO y PC 12 la translocación de PKC delta a la fracción particulada (103, 106) y de PKC theta y mu al mismo compartimento en células eritroleucémicas tratadas con TPA (42).

En otros tipos celulares se han reportado resultados que coinciden o difieren de lo encontrado en hepatocitos de rata: en cardiomiocitos de rata la norepinefrina transloca selectivamente a PKC delta y épsilon, y al mismo tiempo induce su modulación negativa después de periodos largos de incubación (107), mientras que con células CHO se encontró que la vía de transducción hormonal inducida por trombina es capaz de promover la modulación negativa de épsilon y beta al incubárseles de 1 a 3 horas con dicha sustancia (79).

Se ha postulado que la translocación de la PKC está directamente relacionada a la activación de la enzima, entendiendo que ésta ejerce su actividad de cinasa preferentemente en las regiones membranales. Sin embargo los resultados obtenidos en este estudio demuestran que estos dos fenómenos no siempre están ligados, ya que por una parte delta, quien no dio visos de redistribuirse al incubarse con ambos activadores, se pudo observar que presenta actividad enzimática bajo los mismos tratamientos, situación que también se manifestó con PKC alfa cuando se incubó con epinefrina. En cambio con alfa, theta y zeta, aunque se translocaron en respuesta al tratamiento con TPA, sufrieron pérdidas considerables en su actividad, y aparentemente, sólo en el caso de PKC zeta, por cambios en su estado de fosforilación. Existe evidencia experimental que apoya nuestros datos, ya que se ha reportado en un trabajo con células CHO-K1, tratadas con TPA, que hay redistribución de PKC delta en un estado catalíticamente inactivo, lo que pone en duda que la translocación sea un sinónimo de activación (106).

Los resultados indican que la redistribución y la "down-regulation" de las 7 isoformas de PKC en hepatocitos de rata son eventos complejos que dependen de varios factores: el tipo celular, las isoformas expresadas, el estímulo aplicado, el tiempo de incubación y la posible intervención de proteínas intracelulares de anclaje. La injerencia de tantas variables no permite establecer o sugerir una relación directa entre translocación y modulación negativa de la PKC por efectos del TPA o por vía hormonal. Las bases moleculares de la translocación de la PKC no han sido dilucidadas. Hasta el momento sólo se ha sugerido la manera en que el dominio regulatorio de la PKC puede interaccionar con la membrana plasmática. Se ha postulado que las regiones C1 y C2 de la enzima son las que contactan con los fosfolípidos, en donde los ésteres de forbol o el diacilglicerol actuarían como "ancladores hidrofóbicos" favoreciendo el enlazamiento con la membrana, mientras que la región C2 tendría una afinidad hacia lípidos aniónicos, la cual sería regulada por el calcio; ambos mecanismos se producirían de manera independiente entre sí y es probable que se presente un efecto sinérgico que estabilice estas interacciones (22). Recientemente, un estudio ha sugerido que el estado de fosforilación de la enzima puede contribuir a la translocación de la PKC. Particularmente el estudio se hizo con una PKC encontrada en el molusco *Aplysia californica*, la cual es análoga a las PKC nuevas de mamífero. Esta proteína, llamada Apl II, mostró que al ser fosforilada en la serina 36, residuo ubicado en la región C2, incrementaba la unión a fosfatidilserina en estudios *in vitro* y que su redistribución a las membranas se hacía más eficiente (108). Este efecto recién reportado no ha sido encontrado en PKC de mamífero y pudiera ser una característica particular en estas células de molusco. Al menos en el caso de PKC alfa en nuestro sistema, el incremento en la fosforilación de la Ser 657 del extremo carboxilo inducido por epinefrina, no provoca la redistribución de esta isoenzima a la membrana.

Otro tipo de trabajos, como los realizados por Ohmori et al. mencionan diferentes mecanismos de translocación de PKC delta en células CHO-K1, utilizando la técnica de inmunofluorescencia con GFP (Green Fluorescence Protein). Estos autores observaron que la activación de PKC, mediada por receptores purinérgicos, produce una translocación transitoria de la enzima a la membrana plasmática,

mientras que si la activan con TPA se produce una redistribución irreversible hacia el mismo compartimento, y de manera inesperada, el tratamiento con H_2O_2 , otro activador de PKC delta, no promovió la translocación (106). La forma en que los activadores disparan dichos mecanismos posiblemente se debe a la manera en que se procesa la señal, puesto que el TPA se une a la PKC de forma directa, sostenida y prolongada debido a la baja metabolización del TPA en la célula (17); al contrario las hormonas, entre ellas la epinefrina, utilizan la ruta de transducción de señales típica, en donde los segundos mensajeros diacilglicerol y calcio son los que activan a la enzima. Considerando que estos compuestos son metabolizados con mayor rapidez por la célula, la interacción con la enzima es menos prolongada en comparación con el TPA (17). Los complejos de señalización que se formarán en cada caso pueden ser muy disímiles, lo que desembocaría en respuestas diferenciales de las PKC inducidas y en sus maneras de translocarse.

Una de las propuestas que han surgido para explicar la translocación consiste en la intervención de proteínas de "andaje" (scaffolding proteins) quienes potencialmente contribuirían a la distribución subcelular de las PKCs. Es cada vez más evidente que la presencia de motivos o módulos en las proteínas es determinante para las interacciones específicas proteína-proteína, e incluso puede jugar un papel crucial en la localización precisa de elementos que se comparten en las cascadas de transducción, lo cual optimizaría el contacto proteína-proteína evitando al mismo tiempo una intercomunicación innecesaria. Se han encontrado proteínas adaptadoras que forman complejos multienzimáticos con cinasas y/o fosfatasa (AKAPs) que intervienen en más de una vía de señalización, manteniéndolas en sitios específicos en los que tienen acceso a sustratos localizados en ese lugar (101). Otras evidencias han mostrado que cuando se activa la PKC se asocia con proteínas de la fracción particulada, probablemente del citoesqueleto, así como con proteínas nucleares (102). Una de estas moléculas es conocida como RACK (receptor for activated C kinase) quien probablemente funge como "enganchador" de la PKC en sitios específicos de la membrana plasmática para estabilizar a la enzima y favorecer la fosforilación del sustrato. La unión PKC-RACK depende de la presencia de fosfatidilserina, DAG y calcio, de tal modo que es muy alta la probabilidad de que el enlace se efectúe con una PKC activada (27). Se ha logrado identificar los sitios de contacto entre RACK 1 y PKC beta localizándose estos paralelamente en el dominio C2 de esta isoenzima; interesantemente, se ha logrado inhibir la traslocación de PKC epsilon, estimulada por TPA, en cardiomiocitos después de inyectar péptidos dirigidos a estos sitios de contacto (109). De modo análogo, un péptido similar a una secuencia obtenida de la región C2 de PKC beta inhibió la redistribución de las isoformas α y β en células pancreáticas (110). Lo anterior refuerza la idea de que las RACKs pudiesen involucrarse en la translocación de la PKC en la fase en que ésta es anclada a la membrana, sin embargo no se tienen evidencias que señalen los mecanismos que hacen posible el traslado en sí de la PKC desde el citoplasma hacia las regiones particuladas. Es posible especular la existencia de proteínas que tengan un papel importante en la redistribución de las PKC, sin embargo hasta el momento sólo se sabe que las moléculas o proteínas ancladoras son capaces de contactar con las PKC, las cuales no sólo son del tipo RACK sino también de otras clases de proteínas como las AKAPs (100), diversas proteínas del

citoesqueleto como la actina y la tubulina (100) y los propios sustratos de la PKC como los STICKS (66). Esta diversidad de interacciones confirma la importancia de la PKC en la transducción de señales, aunque se desconoce el papel que puedan tener estas asociaciones proteína-proteína en el mecanismo de la translocación.

Actividad enzimática de la PKC

La regulación de la PKC está determinada por su estado de fosforilación además de depender de la interacción con sus activadores. En la célula, la PKC recién sintetizada, requiere ser fosforilada en tres residuos conservados que son necesarios para la "maduración" de la misma. En el caso de alfa, uno de ellos ocurre en la llamada "asa de activación" (Thr 497) la cual es esencial para la actividad catalítica y los otros dos, (Thr 638 y Ser 657) ubicados en el extremo carboxilo terminal, intervienen en el control de la fosforilación y en regular las tasas de desfosforilación de la enzima (86). Después de ser fosforilada en estos residuos clave, se dice que la PKC es catalíticamente competente, es decir, debido a la fosforilación en el asa de activación, la enzima tiene expuesto su sitio activo, con el cual es capaz de realizar su función de cinasa (21). Los estudios *in vitro* realizados en la presente tesis para investigar la actividad enzimática de la PKC, nos muestran que las isoenzimas de PKC exhiben diferentes comportamientos catalíticos dependiendo no sólo de las condiciones en que se procesaron sino también del tipo de activador usado.

Primeramente, la incubación *in vivo* de hepatocitos con TPA y la purificación posterior de las isoformas α , δ , θ y ζ sin la adición de inhibidores de fosfatasa, mostraron una caída considerable en su actividad catalítica *in vitro* del orden de 60% para alfa, 80% para delta, 84% para theta y 75% para zeta con respecto a la actividad de las mismas isoformas de hepatocitos incubados en ausencia de TPA (ver figura 9 y tablas II y III). Reportes previos han mostrado que la PKC alfa, obtenida de células incubadas a tiempos cortos con TPA, exhibió una pérdida de actividad cinasa semejante a lo encontrado en nuestros ensayos (25). Es probable que la caída de la actividad en las 4 isoformas de PKC se deba a la acción inespecífica de fosfatasa endógenas, liberadas durante el lisado celular y posiblemente presentes en el proceso de purificación e inmunoprecipitación de las enzimas, lo que promovió la desfosforilación de las PKC abatiendo su actividad, ya que existe evidencia que indica que la actividad de PKC alfa está modulada por la fosforilación pues se ha encontrado que el TPA induce la formación de formas desfosforiladas de alfa las cuales son inactivas (119). En otro reporte se observó que una forma purificada de PKC alfa podía ser inactivada después de haber sido tratada con fosfatasa (120).

Se ha observado en células COS-1, utilizando mutagénesis dirigida, que la carencia del grupo fosfato en los residuos Thr 638 o en Thr 497 de la PKC alfa la hace muy susceptible a la acción de fosfatasa y agentes oxidantes ocasionando su inactivación (26). Otro reporte, usando a células de cerdo LLC-PK1, ha señalado que la PKC alfa tratada con TPA y mutada en su sitio Ser 657 por alanina, exhibió

una disminución drástica de su actividad enzimática, mientras que la enzima nativa, que conservó fosforilada a Ser 657, mantiene su capacidad enzimática bajo las mismas condiciones. Lo anterior indica un papel de suma importancia para la Ser 657 en el mantenimiento de la actividad de la proteína (27). Para las isozimas δ , θ y ζ , hasta el momento no se conocen con exactitud los residuos fosforilados análogos a PKC alfa, aunque es probable que la desfosforilación causada por las fosfatasa endógenas tenga una función desactivadora semejante a lo ocurrido con alfa.

Para evaluar el papel de las fosfatasa en la actividad de la PKC, se realizaron los mismos experimentos, incubando con TPA por 5 minutos *in vivo* a los hepatocitos y obteniendo a las mismas isoformas, pero ahora agregando una mezcla de inhibidores de fosfatasa en la extracción e inmunoprecipitación de las enzimas, para mantener intacto su estado de fosforilación. Los resultados revelaron que dos isozimas, delta y zeta no perdieron su capacidad catalítica en comparación a los controles, es decir, al evitarse su desfosforilación, se recuperó su actividad de cinasa, pero sorprendentemente, dos isoformas, alfa y theta no mostraron una recuperación significativa de su actividad, registrando valores muy parecidos a los lotes tratados en ausencia de inhibidores de fosfatasa (figura 10). Respecto a estas isoformas, la pérdida de actividad de cinasa encontrada, a pesar de la presencia de inhibidores de fosfatasa, sugiere que en estas dos isozimas la caída de su actividad enzimática no está determinada únicamente por el fenómeno de desfosforilación en la proteína. Para evaluar esta presunción, se realizó un experimento para detectar a PKC alfa fosforilada en la Ser 657 utilizando un anticuerpo sitio-específico. Como se mencionó anteriormente, se ha sugerido que el residuo Ser 657 fosforilado, presente en el extremo carboxilo de la PKC alfa, mantiene la estabilización estructural de la enzima cuando es activada por TPA, evitando que sea atacado por fosfatasa o agentes oxidantes (86). Los resultados mostraron que con los hepatocitos tratados con TPA, la PKC alfa se pudo detectar como una especie parcialmente fosforilada en un 50% en Ser 657 (figura 13), lo cual en parte se puede deber a la acción de los inhibidores de fosfatasa, pero al mismo tiempo, nos señala que alfa, estando aún fosforilada, presentó una caída considerable en su actividad enzimática, lo cual se contrapone con la aseveración de que la actividad está supeditada solamente por el estado de fosforilación de la PKC. Esto sugiere la existencia de otro tipo de modificación en PKC alfa que intervenga en la caída de la actividad. Una posibilidad sería la presencia de proteínas adaptadoras afines a la PKC durante su activación con TPA. De estas proteínas hay una familia especialmente interesante: las AKAPs, quienes son moléculas capaces de unir coordinadamente a PKA, fosfatasa y PKC en diferentes sitios subcelulares (67). De todas ellas se ha estudiado más atentamente a AKAP 79, la cual ha resultado ser una proteína que es capaz de unir a varias isoformas de PKC (α , β II, δ , ϵ , θ y ζ). Incluso se ha hallado que la especie homóloga en rata de AKAP 79, AKAP 150, puede coimmunoprecipitarse con PKC α , β II, δ , ϵ , ζ e ι (114). En estudios realizados con PKC β II se ha determinado que AKAP 79, en su fragmento 31 a 52, se asocia a la enzima sin necesidad de que ella esté activada. También se reportó que AKAP 79 contacta a PKC β II en su sitio catalítico de tal modo que bloquea gradualmente la actividad catalítica de la PKC dependiendo de los residuos del sitio activo con los que se enlaza (114).

De esta manera es posible suponer que PKC alfa se contacte con AKAP durante el tratamiento in vivo de los hepatocitos con TPA y que esta interacción proteína-proteína se mantenga en los inmunoprecipitados. Debido a que existen múltiples sitios de contacto entre la región catalítica de PKC y el segmento 31-52 de AKAP, que al parecer afectan en mayor o en menor medida su actividad, esta interacción contribuiría de modo importante al abatimiento de la actividad enzimática de la PKC α , a pesar de que se mantenga aún fosforilado el residuo Ser 657 en un 50 %. De acuerdo a los resultados de actividad enzimática correspondientes a PKC theta, existe la posibilidad de que AKAP ejerza un fenómeno similar a lo ocurrido con alfa, aunque hasta la fecha, al igual que con alfa, no se conozcan específicamente los residuos del sitio catalítico que contactan con AKAP, ni se ha identificado el residuo análogo en PKC θ de la Ser 657 de PKC α , el cual pudiera estar implicado en la regulación de su actividad catalítica.

En contraste con los resultados obtenidos al estimular a las células con TPA, la actividad enzimática in vitro de alfa, delta, theta y zeta, obtenidos de hepatocitos incubados con epinefrina por cinco minutos, no disminuyó con respecto a los lotes control sin importar que estuvieran presentes o no los inhibidores de fosfatasa. En presencia de los inhibidores de fosfatasa, las actividades catalíticas de los lotes control y de los lotes tratados con la hormona prácticamente fueron similares, es decir, las enzimas no disminuyen su capacidad de cinasa, pero tampoco presentaron un aumento significativo (Figura 12 y tablas II y III). La explicación más sencilla para esta situación probablemente se deba a que están bloqueadas las fosfatasa endógenas por la presencia de sus inhibidores, lo que permitiría que las isozimas se encuentren adecuadamente fosforiladas y pueden mantener sin alteración su actividad catalítica, apoyando la importancia del estado de fosforilación en la actividad de la PKC. Es notable que bajo estas condiciones la epinefrina presente a las 4 isoformas estudiadas sin perder su capacidad cinasa, mientras que con TPA sólo delta y zeta presentan comportamientos semejantes, señalando la posibilidad de que el ester de forbol y la epinefrina produzcan diferentes tipos de asociaciones o complejos moleculares durante el proceso de activación de PKC.

Sin la presencia de inhibidores de fosfatasa, se esperaba un resultado similar a lo encontrado con TPA, en donde se detectaba una caída evidente en la actividad de las 4 isoformas, probablemente causada por su desfosforilación por fosfatasa endógenas. Sin embargo se observó que la actividad de las 4 isoformas de PKC, no sólo no disminuye sino que es notablemente mayor con respecto a los lotes control, sobresaliendo delta y zeta, quienes presentan un 75% y un 48% de incremento en su actividad respectivamente, a pesar de estar expuestas a las fosfatasa endógenas y encontrarse en un estado de fosforilación poco favorable (figura 11). Este fenómeno de potenciación en la actividad de las PKC se conoce como "up-regulation", en contraparte a la "down-regulation" o modulación negativa. Su presencia pone en duda la hipótesis de que solamente el estado de fosforilación, en este caso del extremo carboxilo terminal, es el evento indispensable que determina su actividad catalítica.

Es evidente que los efectos de la epinefrina sobre la actividad de las isoformas de PKC difieren completamente de los ejercidos por el TPA. Para dilucidar el modo en que la incubación de hepatocitos con epinefrina interviene en el estado de fosforilación de PKC α , se realizaron también los experimentos para examinar el estado de fosforilación del residuo Ser 657, con el anticuerpo anti-PKC α sitio-específico como se menciona en los métodos experimentales. El análisis por Western blot del inmunoprecipitado de PKC alfa, mostró que alfa reveló una señal de mayor intensidad con respecto a las PKC derivadas de células control, es decir, epinefrina promovió la fosforilación de PKC alfa en presencia de inhibidores de fosfatasa en el sitio Ser 657 (figura 13). Lo anterior no es consistente con la actividad enzimática *in vitro* observada en alfa, en presencia de inhibidores de fosfatasa, ya que se esperaría que la hiperfosforilación produjera mayor actividad, y ésta fue menor que la obtenida en ausencia de inhibidores de fosfatasa. Es posible que para delta, theta y zeta ocurra algo similar a lo encontrado en alfa aunque aún no se cuentan con evidencias experimentales.

La diferencia manifiesta de los efectos del TPA y de la epinefrina sobre la actividad enzimática de las 4 isoformas estudiadas, sobre todo cuando se trataron de los lotes que no contenían inhibidores de fosfatasa, causando la pérdida de actividad en el caso del TPA o la potenciación de la actividad cuando se trató de la hormona, nos indican claramente que el estado de fosforilación de la enzima es un factor importante en el control de la actividad catalítica, pero que esta misma requiere de otros factores adicionales al estado de fosforilación de las PKC. Una posibilidad que pudiera explicar las diferentes respuestas entre ambos tipos de activadores, radicaría en la naturaleza de la señal para activar a PKC. En ese aspecto la epinefrina, a diferencia del TPA, necesita enviar la señal a través de la vía de transducción en donde intervienen receptores, transductores, efectores y amplificadores. Esta manera de procesar la señal, debido a que involucra a más elementos intracelulares, posibilita que la PKC pueda interactuar con proteínas adaptadoras u otras moléculas que puedan modificar su estructura como una consecuencia de su interacción y participar en posibles mecanismos integrativos de señalización, mientras que el TPA actúa directamente sobre la PKC. Hasta la fecha, de todas estas moléculas adaptadoras sólo se tiene el reporte de una de ellas, la cual se ha visto que afecta la actividad catalítica de la PKC: el sindecan-4, quien es un proteoglicano involucrado en la adhesión celular (100). Se ha reportado que este sindecan-4 puede coimmunoprecipitar con PKC α y que la interacción establecida entre el dominio catalítico de alfa y una secuencia del tallo citoplásmico de sindecan-4, potencia la activación de PKC α mediada por fosfolípidos (115). Lo anterior abre la posibilidad de que en hepatocitos de rata existan moléculas parecidas que puedan intervenir en la potenciación de la actividad enzimática de PKC α , δ , θ y ζ , estimulada por epinefrina y que sea un evento paralelo al estado de fosforilación de las enzimas. Se están realizando estudios en el laboratorio encaminados a identificar a las proteínas con las que se asocian las diferentes isoformas de PKC, quedando por ser demostrada esta hipótesis.

Otro factor que pudiera contribuir en los efectos potenciadores de la epinefrina en la actividad de las 4 isozimas examinadas, al margen de su estado de fosforilación, radicaría en que la activación inducida por TPA y por diacilglicerol, posiblemente no sea equivalente. Aunque los activadores farmacológicos y hormonales de la PKC utilizados en los ensayos de actividad comprenden la interacción con la región C1 de la enzima, estudios recientes en la activación de PKC alfa *in vitro* han mostrado que el diacilglicerol y el TPA interactúan con diferentes afinidades en los subdominios C1A y C1B, los cuales se han denominado como sitios de baja y alta afinidad para ésteres de forbol respectivamente (116). Así entonces, se ha reportado que el diacilglicerol al interactuar primero con el sitio de baja afinidad para ésteres de forbol, produce un efecto acumulativo que conduce a una mayor intensidad en la asociación con el sitio de alta afinidad, y de esta forma se potencia el nivel de actividad de la PKC (117). En contraste, el TPA se enlaza directamente al sitio de alta afinidad a ésteres de forbol, y aunque induce la actividad de PKC, no produce la potenciación presentada por el diacilglicerol. Posiblemente estas diferencias en los efectos activadores entre TPA y epinefrina tengan una participación en el comportamiento catalítico de las PKC α , δ , θ y ζ además del papel que juega su estado de fosforilación. Incluso se ha sugerido que los sitios de baja y alta afinidad a ésteres de forbol pueden diferir para cada tipo de isoforma (118), lo que posibilitaría que la actividad inducida por TPA o diacilglicerol pueda ser diferencial y que cada isozima pudiera tener una respuesta específica dependiendo del activador. Sin embargo estos efectos no han sido reportados en condiciones *in vivo*.

CONCLUSIONES

En hepatocitos de rata se coexpresan al menos siete isoformas de la PKC: alfa, beta, delta, theta, mu, épsilon y zeta.

La semipurificación de las PKCs mediante cromatografía con DEAE-celulosa, indica que varias isoformas se pueden presentar al menos como dos especies moleculares diferentes que se pueden separar con esta técnica.

La redistribución que presentan las PKCs activadas depende del tipo de isoforma y del estímulo empleado para activar a la enzima (vía farmacológica con TPA o vía receptor con epinefrina).

En hepatocitos de rata, no existe una relación directa entre la translocación de las PKCs activadas y su modulación negativa, por lo que es probable que ambos eventos sean independientes entre sí.

La redistribución de la PKC no siempre significa que la enzima esté activada, pues la PKC puede presentar actividad y no experimentar translocación.

La actividad enzimática de las isoformas alfa, delta, theta y zeta es afectada de manera diferencial por el TPA y la epinefrina, produciendo efectos opuestos en ella. El TPA induce una desfosforilación en el extremo carboxilo de PKC alfa, mientras que la epinefrina induce un incremento en la fosforilación del mismo residuo de PKC.

En la regulación de la actividad de la PKC, participa de manera importante la modulación de su estado de fosforilación, pero pueden existir otros factores aún no esclarecidos.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

REFERENCIAS

- 1.- Moran L.A., Scrimgeour K.G., Horton H.R., Ochs R.S., Rawn J.P. *Biochemistry* (1994). Prentice Hall 2da edición USA, p.p. 1115.
- 2.- Gennis. R.B. *Biomembranes. Molecular structure and function* (1989). Springer Verlag USA. p.p. 551.
- 3.- Schenk P.W., Snaar-Jagalska B.E. (1999). Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1449: 1-24.
- 4.- Hardie D.G. *Biochemical messengers* (1991). Chapman and Hall. England. p.p. 297.
- 5.- Neer E.J., Clapham D.E. (1988). Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature* 33: 129-134.
- 6.- Heldin C.H., Purton M. *Signal Transduction.* (1997). Chapman and Hall. England. p.p. 365
- 7.- Liu W.S., Heckman C.A. (1998). The seven fold way of PKC regulation. *Cell Signal.* 10: 529-542.
- 8.- Michell R.H. (1975). Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta.* 415: 81-47.
- 9.- Strader C.D., Candelore M.R., Hill W.S. (1989). Identification of two serine residues involved in agonist activation of the beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 264: 13572-13578.
- 10.- Lee C.H., Park D., Wu D., Rhee S.G., Simon M.I., (1992). Members of the Gq alpha subunit gene family activate phospholipase C beta isozymes. *J. Biol. Chem.* 267: 16044-7.
- 11.- Boyer J.L., Waldo G.L., Evans T., Northup J.K., Downes C.P., Harden T. K. (1989). Modification of AIF-4- and receptor-stimulated phospholipase C activity by G-protein beta gamma subunits. *J. Biol. Chem.* 264: 13917-22.
- 12.- Kishimoto A., Takai Y., Mori T., Kikkawa U., Nishizuka Y. (1980). Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* 255: 2273-2276.
- 13.- Dempsey E.C., Newton A.C., Mochly-Rosen D., Fields A.P., Reyland M., Insel P.A., Messing R.O. (2000). Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279: L429-L438.
- 14.- Hayashi A., Seki N., Hattori A., Kozuma S., Saito T. (1999). PKC ν a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKC μ . *Biochim. Biophys. Acta.* 1450: 99-106.
- 15.- Mellor H., Parker P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332: 281-292.
- 16.- Valverde A. M., Sinnet-Smith, Van Lint J., Rozengurt E. (1994). Molecular cloning a characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8572-8576.
- 17.- Robles Flores M. (1992). Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Facultad de Química. UNAM.
- 18.- Zhang G., Kazanietz M.G., Blumberg P.M., Hurley J.H. (1995). Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell* 81: 917-924.

- 19.-Mott H.R., Carpenter J.W., Zhang S., Ghosh S., Bell R.M., Campbell S.L. (1996). The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel ras and phospholipid binding site. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 8312-8317.
- 20.- Shao X., Davletov Y., Sutton RB., Sudhof T.C., Rizo J. (1996). Bipartite Ca²⁺-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science* 273: 248-251.
- 21.- Newton A.C. (1995). Protein kinase C. Seeing two domains. *Curr. Biol.* 5: 937-976.
- 22.- Newton A.C., Johnson J.E. (1998). Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim. Biophys. Acta:* 1376: 155-172.
- 23.-Toker A. (1998). Signaling through protein kinase C. *Front. Biosci.* 3: 1134-1147.
- 24.- Orr W., Newton A.C. (1994). Requirement for negative charge on "activation loop" of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 269: 27715-27718.
- 25.- Kiley S., Parker P.J. (1995). Differential localization of protein kinase C isozymes in U937 cells: evidence for distinct isozyme functions during monocyte differentiation. *J. Cell Sci.* 108: 1003-1016.
- 26.- Mosior M., Newton A.C. (1996). Calcium-independent binding to interfacial phorbol esters causes protein kinase C to associate with membranes in the absence of acidic lipids. *Biochemistry.* 35: 1612-1623.
- 27.- Mochly-Rosen D., Kauvar L.M. (1998). Modulating protein kinase C signal transduction. *Adv. Pharmacol.* 44: 91-145.
- 28.- Smith J.B., Smith L., Pettit G.R. (1985). Bryostatins: potent, new mitogens that mimic phorbol ester tumor promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*132: 939-45.
- 29.- Kikkawa Y., Kishimoto A., Nishizuka Y. (1989). The protein kinase C family: heterogeneity and its implications. *Ann. Rev. Biochem:* 58: 31-44.
- 30.- Ulosas M.D., Battle E., Coll O., Skoudy A., Fabre M., Garcia Herreros A. (1996). Evidence for a role of conventional protein kinase-C alpha in the control of homotypic contact and cell scattering of HT-29 human intestinal cells. *Biochem J.* 315: 1049-1054.
- 31.- Romanova L. Y., Alexandrov I.A., Schwab G., Hilbert D. M., Mushinski J.F., Nordan R.P. (1996). Mechanism of apoptosis suppression by phorbol ester in IL-6-starved murine plasmacytomas: role of PKC modulation and cell cycle. *Biochemistry* 335: 9900-9906.
- 32.- Manni A., Buckwalter E., Etindi R., Kunselman S., Rossini A., Mauger D., Dabbs D., Demers L. (1996). Induction of a less aggressive breast cancer phenotype by protein kinase C-alpha and -beta overexpression. *Cell Growth Differ.* 7: 1187-1198.
- 33.- Choi P.M., Tcho-Wang K.M., Weinstein B.I. (1990). Overexpression of protein kinase C in HT29 colon cancer cells causes growth inhibition and tumor suppression. *Mol. Cell Biol.* 10: 4650-4657.
- 34.- Borner C., Ueffing M., Jaken S., Parker P., Weinstein B.I. (1995). Two closely related isoforms of protein kinase C produce reciprocal effects on the growth of rat fibroblasts. Possible molecular mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270: 78-86.
- 35.- Inoguchi T., Battan R., Handler E., Sporstman J.R., Heath W., King G.L. (1992). Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic

rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 11059-11063.

36.- Tanaka C., Nishizuka Y. (1994). The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu Rev. Neurosci.* 17: 551-567.

37.- Szallasi Z., Denning M.F., Smith C.B., Dlugosz A.A., Yuspa S.H., Pettit G.R., Blumberg P.M. (1994). Bryostatin 1 protects protein kinase C-delta from down-regulation in mouse keratinocytes in parallel with its inhibition of phorbol ester-induced differentiation. *Mol. Pharmacol.* 48: 840-850.

38.- Chen C.C., Wu M.L. (1995). Protein kinase C isoform delta is involved in the stimulation of the Na(+)-H+ exchanger in C6 glioma cells. *Mol. Pharmacol* 48: 995-1003.

39.- O'Driscoll K.R., Teng K.R., Fabbro D., Greene L.A., Weinstein I.B. (1995). Selective translocation of protein kinase C-delta in PC12 cells during nerve growth factor-induced neuritogenesis. *Cell.* 6: 449-458.

40.- Gschwendt M. (1999). Protein kinase C delta. *Eur. J. Biochem.* 259: 555-564.

41.- Greif H., Ben-Chaim J., Shimon T., Bechor E., Eldar H., Livneh E. (1992). The protein kinase C-related PKC-L(eta) gene product is localized in the cell nucleus. *Mol. Cell Biol.* 12: 1304-1311.

42.- Passalacqua M., Patrone M., Sparatore M., Melloni E., Pontremoli S. (1999). Protein kinase C-theta is specifically localized on centrosomes and kinetochores in mitotic cells. *Biochem J.* 337: 113-118.

43.- Cacace A.M., Guadagno S.N., Krauss R.S., Fabbro D., Weinstein I.B. (1993). The epsilon isoform of protein kinase C is an oncogene when overexpressed in rat fibroblasts. *Oncogene* 8: 2095-20104.

44.- Schonwasser D.C., Marais R.M., Marshall C.J., Parker P.J. (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol. Cell Biol.* 18: 790-798.

45.- Cai H., Smola U., Wixler U., Einsenmann-Trappe Y., Diaz-Meco M.T., Moscat J., Rapp U., Cooper G.M. (1997). Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol Cell Biol.* 17: 732-741.

46.- Fagerstrom S., Pahlman S., Gestblom C., Nanberg E. (1996). Protein kinase C-epsilon is implicated in neurite outgrowth in differentiating human neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ.* 7: 775-785.

47.- Prekeris R., Mayhew M.W., Cooper J.B., Terrian D.M. (1996). Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function. *J. Cell Biol.* 132: 77-90.

48.- Zhao L., Standaert M.L., Cooper D.R., Avignon A., Farese H. (1994). Effects of insulin on protein kinase-C (PKC) in HIRC-B cells: specific activation of PKC epsilon and its resistance to phorbol ester-induced down-regulation. *Endocrinology* 135: 2504-2510.

49.- Sidorenko S.P., Law C.L., Klaus S.J., Chandran K.A., Takata M., Kuyosaki T., Clark E.A. (1996). Protein kinase C mu (PKC mu) associates with the B cell antigen receptor complex and regulates lymphocyte signaling. *Immunity* 5: 353-363.

50.- Fleming I., Mackenzie S.J., Vernon R.G., Anderson N.G., Houslay M.D., Kilgour E. (1998). Protein kinase C isoforms play differential roles in the regulation of adipocyte differentiation. 333: 719-727.

51.- Diaz-Meco M.T., Lozano J., Municio M.M., Berra E., Frutos S., Sanz L., Moscat J. (1994). Evidence for the in vitro and in vivo interaction of Ras with protein kinase C zeta. *J. Biol. Chem.* 269: 31706-31710.

52.- Berra E., Diaz-Meco M.T., Lozano J., Frutos S., Municio M.M., Berra E., Frutos S., Sanz L., Moscat J. (1995). Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. *EMBO J.* 14: 6157-6163.

53.- Diaz-Meco M.T., Municio M.M., Frutos S., Sanchez P., Lozano J., Sanz L., Moscat J. (1996). The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell* 86: 777-786.

54.- Murray N.R., Fields A.P. (1997). Atypical protein kinase C iota protects human leukemia cells against drug-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272: 27521- 27524.

55.- Bandyopadhyay G., Standaert M.L., Galloway L., Moscat J., Farese R.V. (1997). Evidence for involvement of protein kinase C (PKC)-zeta and noninvolvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes. *Endocrinology*.138: 4721-4731.

56.- Keranen L.M., Dutil E.M., Newton A.C. (1995). Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr. Biol.* 5: 1394-1403.

57.- Le Good J.A., Ziegler W. H., Parekh D.B., Alessi D.R., Cohen P., Parker P.J. (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281: 2042-2045.

58.- Soltoff S.P., Toker A. (1995). Carbachol, substance P, and phorbol ester promote the tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta in salivary gland epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 270: 13490-13495.

59.- Denning M.F., Dlugosz A.A., Threadgill D.W., Magnuson T., Yuspa S.H. (1996). Activation of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta. *J. Biol. Chem.* 271: 5325-5331.

60.- Xu R.X., Pawelczyk T., Xia T.H., Brown S.C. (1997). NMR structure of a protein kinase C-gamma phorbol-binding domain and study of protein-lipid micelle interactions. *Biochemistry* 36: 10709-10717.

61.- Mosior M., Epand R.M. (1994). Characterization of the calcium-binding site that regulates association of protein kinase C with phospholipid bilayers. *J.Biol. Chem.* 69: 13798-13805.

62.- Hui S.W., Boni L.T., Stewart T.P., Isac T. (1983). Molecular organization in cholesterol-lecithin bilayers by X-ray and electron diffraction measurements. *Biochemistry* 22: 1159-64.

63.- Mochly-Rosen D., Khaner H., Lopez J. (1991). Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3997-4000.

64.- Robles-Flores M., Rendón-Huerta E., García-Sainz A. (1997). Purification and characterization of receptors for activated protein kinase C from rat hepatocytes. *Protein Expr. Purif.* 10: 32- 37.

65.- Csukai M., Chen C.H., De Matteis M. A., Mochly-Rosen D. (1997). The coatomer protein beta'-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase C epsilon. *J.Biol. Chem.* 272: 29200-6.

66.- Rendón-Huerta E., Mendoza-Hernández G., Robles-Flores M. (1999). Characterization of calreticulin as a protein interacting with protein kinase C. *Biochem J.* 344: 469-475.

67.- Klauk T.M., Faux M.C., Labudda R., Langeberg L.K., Jaeken S., Scott J.D. (1996). Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science* 271: 1589-1592.

68.- Puls A., Schmidt S., Grawe F., Stabel S. (1997). Interaction of protein kinase C zeta with ZIP, a novel protein kinase C-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6191-6.

- 69.- Díaz-Meco M.T., Municio M.M., Sanchez P., Lozano J., Moscat J. (1996). Lambda-interacting protein, a novel protein that specifically interacts with the zinc finger domain of the atypical protein kinase C isotype lambda/iota and stimulates its kinase activity in vitro and in vivo. *Mol. Cell Biol.* 16: 105-114.
- 70.- Young S., Parker P.J., Ulrich A., Stabel S. (1987). Down-regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation. *Biochem. J.* 244: 775-779.
- 71.- Kischel T., Harbers M., Stabel S., Borowski P., Müller K., Hilz H. (1989). Tumor promotion and depletion of protein kinase C in epidermal JB6 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165: 981-987.
- 72.- Neng-Yao S., Floyd-Smith G. (1996). Protein kinase C-delta mRNA is down-regulated transcriptionally and post-transcriptionally by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J. Biol. Chem.* 271: 16040-6.
- 73.- Fournier A., Murray A. (1988). Application of phorbol ester to mouse skin causes a rapid and sustained loss of protein kinase C. *Nature.* 330: 767-769.
- 74.- Ase K., Berry N., Kikkawa U., Kishimoto A., Nishizuka Y. (1988). Differential down-regulation of protein kinase C subspecies in KM3 cells. *FEBS Lett.* 236: 396-400.
- 75.- Cochet C., Souvignet C., Keramidis M., Chambaz EM. (1986). Altered catalytic properties of protein kinase C in phorbol ester treated cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134: 1031-1037.
- 76.- Robles-Flores M., Alcantara-Hernandez R., García-Sáinz A. (1991). Differences in phorbol ester-induced decrease of the activity of protein kinase C isozymes in rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1094: 77-84.
- 77.- Kiley S., Schaap D., Parker P.J., Hsieh L.L., Jaken S. (1990). Protein kinase C heterogeneity in GH4C1 rat pituitary cells. Characterization of a Ca²⁺(+)-independent phorbol ester receptor. *J. Biol. Chem.* 265: 15704-15712.
- 78.- Akita Y., Onho J., Yajimna Y., Suzuki K. (1990). Possible role of Ca²⁺(+)-independent protein kinase C isozyme, nPKC epsilon, in thyrotropin-releasing hormone-stimulated signal transduction: differential down-regulation of nPKC epsilon in GH4C1 cells. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 11062-11066.
- 79.- Strulovici B., Daniel-Issakani S., Baxter G., Knopf J., Sultzman L., Cherwinski H., Nestor J., Webb D.R., Ranson J. (1991). Distinct mechanisms of regulation of protein kinase C epsilon by hormones and phorbol diesters. *J. Biol. Chem.* 266: 168-63.
- 80.- Borner C., Nichols-Guadagno S., Fabbro D., Weinstein I.B. (1992). Expression of four protein kinase C isoforms in rat fibroblasts. Distinct subcellular distribution and regulation by calcium and phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 267: 12892-12899.
- 81.- Crabos M., Imber R., Woodtli T., Fabbro D., Erne P. (1991). Different translocation of three distinct PKC isoforms with tumor-promoting phorbol ester in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178: 878-883.
- 82.- Ways D.K., Cook P.P., Webster C., Parker P.J. (1992a). Effect of phorbol esters on protein kinase C-zeta. *J. Biol. Chem.* 267: 4799-4805.
- 83.- Hu11/1/2001wiler A., Fabbro D., Stabel S., Pfeilschifter J. (1992). Immunocharacterization of delta- and zeta-isoenzymes of protein kinase C in rat renal mesangial cells. *FEBS Lett.* 300: 259- 262.
- 84.- Onho S., Konno Y., Yoshiko A., Akihiko Y., Suzuki K. (1990). A point mutation at the putative ATP-binding site of protein kinase C alpha abolishes the kinase activity and renders it down-regulation-insensitive. A molecular link between autophosphorylation and down-regulation. *J. Biol. Chem.* 265: 6296-6300.

- 85.- Pears C., Parker P.J. (1991). Down-regulation of a kinase defective PKC- α . FEBS Lett. 284: 120-122.
- 86.- Bornancin F., Parker P.J. (1996). Phosphorylation of threonine 638 critically controls the dephosphorylation and inactivation of protein kinase C α . Curr. Biol. 6: 1114-1123.
- 87.- Hansra G., Bornancin F., Whelan R., Hemmings B.A., Parker P.J. (1996). 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced dephosphorylation of protein kinase C α correlates with the presence of a membrane-associated protein phosphatase 2A heterotrimer. J. Biol. Chem. 271: 32785-8.
- 88.- Gatti A., Robinson P.J. (1997). Okadaic acid interferes with phorbol-ester-mediated down-regulation of protein kinase C- α , C- δ and C- ϵ . Eur. J. Biochem 249: 92-97.
- 89.- Goode N.T., Hajibagheri N., Parker P.J. (1995). Protein kinase C (PKC)-induced PKC down-regulation. Association with up-regulation of vesicle traffic. J. Biol. Chem. 270: 2669-73.
- 90.- Melloni E., Pontremoli S. (1989). The calpains. TINS. 12: 438-444.
- 91.- Pontremoli S., Melloni E., Salamino F., Patrone M., Michetti M., Horecker B. (1989). Activation of neutrophil calpain following its translocation to the plasma membrane induced by phorbol ester or fMet-Leu-Phe. Biochem. Biophys. Res. Comm. 160: 737-743.
- 92.- Hong D., Huan J., Du B., Yeh J., Saido T.C., Cheeke P.R., Forsberg N. (1995). Protein kinase C isoforms in muscle cells and their regulation by phorbol ester and calpain. Biochim. Biophys. Acta. 1267: 45-54.
- 93.- Von Ruecker., Rao G., Bidlingmaier. (1989). Atrial natriuretic peptide protects hepatocytes against damage induced by hypoxia and reactive oxygen. Possible role of intracellular free ionized calcium. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 27: 531-537.
- 94.- Eto A., Akita T.C., Saido K., Suzuki K., Kawashima S. (1995). The role of the calpain-calpastatin system in thyrotropin-releasing hormone-induced selective down-regulation of a protein kinase C isozyme, nPKC ϵ , in rat pituitary GH4C1 cells. J. Biol. Chem. 270: 25115-20.
- 95.- Lee H.W., Smith L., Pettit G., Smith J. B. (1997). Bryostatins 1 and phorbol ester down-modulate protein kinase C- α and - ϵ via the ubiquitin/proteasome pathway in human fibroblasts. Mol. Pharmacol. 51: 439-447.
- 96.- Nishizawa M.N., Furuno K., Okazaki H., Tanaka Y., Ogawa Y., Sagata N. (1993). Degradation of Mos by the N-terminal proline (Pro2)-dependent ubiquitin pathway on fertilization of Xenopus eggs: possible significance of natural selection for Pro2 in Mos. EMBO J. 12: 4021-4027.
- 97.- Lu Z., Liu D., Hornia A., Devonish W., Pagano M., Foster D. (1989). Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. Mol. Cell. Biol. 18: 839-845.
- 98.- Berry M.N., Friend D.A. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. J. Cell. Biol. 43: 506-520.
- 99.- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- 100.- Jaken S., Parker P.J. (2000). Protein kinase C binding partners. Bioessays 22: 245-254.
- 101.- Dessev G., Iovcheva C., Tasheva B., Goldman R. (1988). Protein kinase activity associated with the nuclear lamina. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2994-2998.

- 102.- Kiley S.C., Jaken S. (1990). Activation of alpha-protein kinase C leads to association with detergent-insoluble components of GH4C1 cells. *Cell Mol. Endocrinol.* 4: 59-68.
- 103.- Rovainen R., Messing R.O. (1993). The phorbol derivatives thymeleatoxin and 12-deoxyphorbol-13-O-phenylacetate-10-acetate cause translocation and down-regulation of multiple protein kinase C isozymes. *FEBS Lett.* 319: 31-34.
- 104.- Caloca M.J., Wang H., Delemos A., Wang S., Kazanietz M.G. (2001). Phorbol esters and related analogs regulate the subcellular localization of beta 2-chimaerin, a non-protein kinase C phorbol ester receptor. *J. Biol. Chem.* 276: 18303-18312.
- 105.- Oancea E., Meyer T. (1998). Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell* 95:307-318.
- 106.- Ohmori S., Shirai Y., Sakai N., Fujii M., Konishi H., Kikkawa U., Saito N. (1998). Three distinct mechanisms for translocation and activation of the delta subspecies of protein kinase C. *Mol. Cell Biol.* 18: 5263-5271.
- 107.- Rhode S., Sabri A., Kamasamudran R., Steinberg S.F. (2000). The alpha(1)-adrenoceptor subtype- and protein kinase C isoform-dependence of Norepinephrine's actions in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32: 1193-1209.
- 108.- Pepio A.M., Sossin W.S. (2001). Membrane translocation of novel protein kinase Cs is regulated by phosphorylation of the C2 domain. *J. Biol. Chem.* 276: 3846-3855.
- 109.- Johnson J.A., Gray M.O., Chen C.H., Mochly-Rosen D. (1996). A protein kinase C translocation inhibitor as an isozyme-selective antagonist of cardiac function. 271: 224962-224966.
- 110.- Yedovitzky M., Mochly-Rosen D., Johnson J.A., Gray M.O., Ron D., Abramovicht E., Cerasi E., Neshet R. *J. Biol. Chem.* (1996). Translocation inhibitors define specificity of protein kinase C isoenzymes in pancreatic beta-cells. 272: 1417-1420.
- 111.- Rennecke J., Johannes F.J., Richter K.H., Kittstein W., Marks F., Gschwendt M. (1996). Immunological demonstration of protein kinase C mu in murine tissues and various cell lines. Differential recognition of phosphorylated forms and lack of down-regulation upon 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate treatment of cells *Eur. J. Biochem.* 242: 428-432.
- 112.- Gysin S. S., Imber R. (1997). Phorbol-ester-activated protein kinase C-alpha lacking phosphorylation at Ser657 is down-regulated by a mechanism involving dephosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 249: 156-160.
- 113.- Hansra G., Garcia-Paramio P., Prevostel C., Whelan R.D.H., Bornancin F., Parker P.J. (1999) Multisite dephosphorylation and desensitization of conventional protein kinase C isotypes. *Biochem. J.* 342: 337-344.
- 114.- Faux M.C., Rollins E.N., Edwards A.S., Langeberg L. K., Newton A.C., Scott J. D. (1999). Mechanism of A-kinase-anchoring protein 79 (AKAP79) and protein kinase C interaction. *Biochem. J.* 343: 443- 452.
- 115.- Woods A., Couchman J.R. (1998). Syndecans: synergistic activators of cell adhesion. *Trends. Cell Biol.* 8: 189-192.
- 116.- Slater S.J., Cojen H., Kelly M.B., Larkin J.D., Taddeo F.J., Yeager M.D., Stubbs D. (1996). Protein kinase Calpha contains two activator binding sites that bind phorbol esters and diacylglycerols with opposite affinities. *J. Biol. Chem.* 271: 4627-4631.

- 117.- Slater S.J., Taddeo F.K., Mazurek A., Stagliano A., Milano S.K., Kelly M.B., Cojen H., Stubbs C.D. (1998). Inhibition of membrane lipid-independent protein kinase C α activity by phorbol esters, diacylglycerols, and bryostatin-1. *J. Biol. Chem.* 272: 23160-23168.
- 118.- Hunn M., Quest A.F. (1997). Cysteine-rich regions of protein kinase C δ are functionally non-equivalent. Differences between cysteine-rich regions of non-calcium-dependent protein kinase C δ and calcium-dependent protein kinase C γ . *FEBS Lett.* 400: 226-232.
- 119.- Borner C., Eppenberger U., Wyss R., Fabbro D. (1988). Continuous synthesis of two protein-kinase-C-related proteins after down-regulation by phorbol esters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2110-2114.
- 120.- Pears C., Stabel S., Cazaubon S., Parker P.J. (1992). Studies on the phosphorylation of protein kinase C- α . *Biochem J.* 283: 515-518.